



Revue Francophone des Laboratoires



**Volume 2016, Issue 479,
Pages 3-90
(February 2016)**

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](http://www.lemondepharmaciens.com)

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](https://www.facebook.com/lemondepharmaciens)

 [#LemondedesPharm](https://twitter.com/LemondedesPharm)

Elsevier Masson SAS
Société par actions simplifiées
à associé unique
au capital de 47 275 384 €
RCS Nanterre B 542 037 031
62, rue Camille-Desmoulins
92130 Issy-les-Moulineaux



Tél./Fax: 01 71 16... + les 4 chiffres
de votre correspondant
<http://www.elsevier-masson.fr>

PRÉSIDENT ET DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :
Daniel Rodriguez

DIRECTRICE DES REVUES PROFESSIONNELLES
Yasmina Ouharzoune
y.ouharzoune@elsevier.com

RÉDACTRICE EN CHEF :
Martine Tirouche
m.tirouche@elsevier.com

CONSULTANT SCIENTIFIQUE DE LA RÉDACTION :
Claude Naudin
clnaudin@numericable.fr

COLLABORATEURS DE LA RÉDACTION :
Revue de presse :
Joël Gozlan, Vincent Maréchal, Michel Segondy
Actualités — Santé publique — Veille juridique :
Jean-Marie Manus

FAX-RÉDACTION : 01 71 16 51 59

MARKETING – RESPONSABLE DE MARCHÉ :
Sonia Tadjdet (58 60)
s.tadjdet@elsevier.com

PUBLICITÉ – DIRECTEUR DES VENTES :
Jean-Marie Pinson (53 10)
Mobile: 06 15 72 16 73
j.pinson@elsevier.com

SERVICE ABONNEMENTS :

Tél. : 01 71 16 55 99 – Fax: 01 71 16 55 77
<http://www.em-consulte.com/infos>

PAO : humancom, 48 rue de Dantzig, 75015 Paris.

IMPRESSION :
Lescure Théol, 27 Douains.

Copyright© 2016 — Elsevier Masson SAS — Tous droits réservés. Cette publication et son contenu sont protégés par le copyright de Elsevier Masson SAS, et les dispositions suivantes s'appliquent à son utilisation : Les simples photocopies d'articles isolés sont autorisées pour un usage privé, dans la mesure où les lois nationales relatives au copyright le permettent. L'autorisation de l'éditeur et le paiement de redevances est obligatoire pour toutes les autres photocopies, y compris les copies multiples ou systématiques, les copies effectuées à des fins promotionnelles ou de publicité, la revente et toute autre forme de distribution de documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les institutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peuvent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevances correspondantes auprès du Centre Français d'Exploitation du Droit de la Copie (20, rue des Grands-Augustins, F – 75006 Paris). Les abonnés sont autorisés à effectuer des copies des tables des matières, ou établir des listes d'articles comprenant des extraits pour un usage interne à l'intérieur de leurs institutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute revente ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'éditeur est requise pour tous autres travaux dérivés, y compris les compilations et les traductions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour saisir de façon électronique tout élément contenu dans la présente publication, y compris tout ou partie d'un article. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indiquée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, saisie dans un système de sauvegarde, ou transmise sous quelque forme que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, sans l'autorisation préalable et écrite de l'éditeur. La responsabilité de l'éditeur ne saurait en aucune façon être engagée pour tout préjudice et/ou dommage aux personnes et aux biens, que cela résulte de la responsabilité du fait des produits, d'une négligence ou autre, ou de l'utilisation de tous produits, méthodes, instructions ou idées contenus dans la présente publication. En raison de l'évolution rapide des sciences médicales, l'éditeur recommande qu'une vérification extérieure intervienne pour les diagnostics et la posologie.

CPPAP 0117 T 81120 – ISSN 1773-035x
Dépôt légal : à parution

Couverture
© BURGER/PHANIE

Index des annonceurs

Bio-Rad	4 ^e de couv.
Elsevier Masson	2 ^e de couv - 4 - 12 - 30 - 68 - 75 - 82
Fumouze Diagnostics	23
Meridian	21
Reed Exhibitions	7

édito

Rage: la fin en 2030 ?

Time to eliminate rabies. Il est temps d'éliminer la rage, pouvait-on lire dans un récent numéro du *Lancet*, en fixant une date, 2030, la même que proposée par ONUSIDA pour l'infection à VIH.

Le *Lancet* révélait que, le 10 décembre, l'OMS, l'Organisation mondiale de la santé animale, la *Food and Agriculture Organization* de l'ONU et l'Alliance mondiale pour la maîtrise de la rage ont lancé un programme pour éliminer la rage d'ici 2030. Initiative qui marque pour la première fois, soulignait le *Lancet*, que médecine humaine et médecine animale ont décidé d'une stratégie commune pour mettre fin à une *maladie dévastatrice mais massivement négligée*...

La rage est une maladie que l'on peut prévenir par la vaccination primaire et par la vaccination post-exposition. Depuis Louis Pasteur, il y a bien longtemps que la rage urbaine a disparu des cités des pays développés, elle n'est plus que sylvatique, et encore... Pourtant, quelque 70 000 personnes meurent encore de la rage chaque année, principalement dans les zones rurales d'Afrique et d'Asie. La rage est une zoonose, la contamination de l'Homme est accidentelle, mais le risque persiste. Contamination due dans 99 % des cas à une morsure de chien, il suffirait de vacciner tous les chiens domestiques, mieux contrôler les chiens errants, responsabiliser les propriétaires de chiens : solution la plus efficace pour éliminer la maladie. Selon des sources autorisées, la vaccination de 70 % des chiens permettrait de supprimer la maladie humaine, sachant que la vaccination canine coûte moins d'un dollar alors que la prophylaxie humaine post-exposition coûte entre 40 et 50 dollars.

Il faut rendre accessibles partout vaccins et immunoglobulines antirabiques, sachant qu'une morsure est mortelle si la prophylaxie n'est pas administrée avant apparition des symptômes. Il est nécessaire de sensibiliser les autorités locales et les populations sur la nécessité de chercher du secours sans délai après morsure. Il faut trouver le nerf de la guerre, ce que réclame régulièrement l'OMS à ses donateurs, pour établir ce réseau mondial antirabique, ses infrastructures biomédicales et ses armes.

Des pays ont montré qu'éliminer la rage est faisable et abordable, dit le *Lancet*, citant l'Afrique du Sud, la Tanzanie, le Bangladesh, les Philippines. L'élimination de la rage, priorité mondiale de santé : les outils existent, il suffit d'y recourir.

RFL

Conseil scientifique

PRÉSIDENT : Paul LAFARGUE (Paris).

BUREAU : Bruno BAUDIN (Paris), Dominique CHABASSE (Angers), Alain CHEVAILLER (Angers), Éric GARNOTEL (Marseille), Michèle IMBERT (Créteil), Marie-Laure JOLY-GUILLOU (Angers), Marc MAYNADIÉ (Dijon), Michel SEGONDY (Montpellier).

COMITÉ :

MEMBRES FRANÇAIS : Frédéric BARBUT (Paris), Patrice BOURÉE (Le Kremlin-Bicêtre), René CHERMETTE (Maisons-Alfort), Claude GUIGUEN (Rennes), Paul HOFMAN (Nice), François JEHL (Strasbourg), Saïd KAMEL (Amiens), Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA (Lyon), Jean-Jacques LATAILLADE (Clamart), Jean-Philippe LAVIGNE (Nîmes), Jérôme LE GOFF (Paris), Michèle MALET (Caen), Vincent MARÉCHAL (Paris), Denis MASSIGNON (Lyon), Thierry MOLINA (Paris).

MEMBRES ÉTRANGERS : Smail BELAZZOUG (Algérie), Ahcène DEMBRI (Algérie), Hicham OUAZZANI (Maroc), Lassaad SARRAI (Tunisie), Abderrahim TAZI (Maroc).

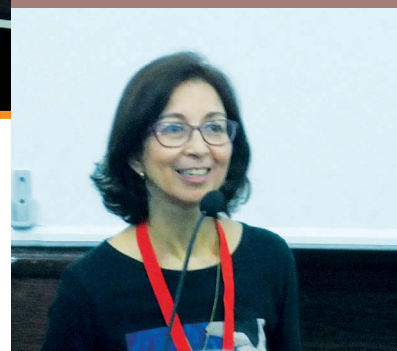
MEMBRES HONORAIRES : Marie-Hélène BESSIÈRES (Toulouse), Jean-Louis KOECK (Bordeaux), Anne-Marie MANEL (Champagne-au-Mont-d'Or), Jean-Claude NICOLAS (Chatou/Princeton, USA), Michel VAUBOURDOLLE (Paris).

L'événement



Un auditoire attentif

L'organisatrice des Journées, le Pr Aïda Bouratbine (Parasitologie médicale, biotechnologie et biomolécules, Institut Pasteur, Tunis, Tunisie)



Congrès des 2^{es} Journées franco-maghrébines de parasitologie et mycologie à Tunis

C'est dans un lieu emblématique, l'Institut Pasteur, où exerça Charles Nicolle, directeur de 1903 à 1936, Prix Nobel de médecine 1929, que sont tenues pour la première fois, à Tunis, les Journées franco-maghrébines de parasitologie et de mycologie médicale (JFMPPM). Cette deuxième édition était organisée en partenariat avec la Société marocaine de mycologie médicale, la Société algérienne de mycologie médicale, la Société française de parasitologie (SFP), la Société française de mycologie médicale (SFMM), la Société tunisienne de pathologie infectieuse et le Groupement des protistologues de langue française (GPLF).

Du 28 au 31 octobre 2015, ces JFMPPM tunisiennes faisaient suite à celles organisées avec succès à Rabat en octobre 2013. La prochaine édition est programmée à Alger, en octobre 2017.

Quelque 300 médecins, enseignants-chercheurs, scientifiques, internes, étudiants et jeunes doctorants, principalement du Maroc, de Tunisie, d'Algérie et de France, ont suivi ces journées très riches sur le plan scientifique et aussi très conviviales, facilitant les échanges entre les équipes.

Avec 3 sessions, 3 symposium, 15 conférences à l'ouverture et aux sessions plénières, 40 communications orales et 160 communications affichées, les Journées ont fait le point des données épidémiologiques, et des présentations des parasites et champignons, leur phylogénie, leur diversité, les aspects cliniques qui s'y rattachent, les nouvelles approches, les méthodes diagnostiques, les moyens thérapeutiques...

Parmi les nouveautés, une mention à la session interactive de 7 cas cliniques avec questions-réponses et évaluation via un boîtier individuel remis aux participants. Autre originalité: la présentation de posters sur écran (*e-posters*) avec possibilité d'en télécharger le contenu préalablement numérisé.

Concrètement ces JFMPPM ont traité à la fois de l'actualité de la prise en charge des patients atteints de pathologies parasitaires, qu'elles soient d'origine féco-orale ou de transmission vectorielle, et fongiques, et de la maîtrise de ces affections, ainsi que de l'avancée de la recherche dans le domaine de la biodiversité des micro-organismes eucaryotes et de leur rôle dans la pathogenèse.

Au total, des Journées réussies, studieuses et chaleureuses, qui révèlent un réel enthousiasme des jeunes générations pour nos disciplines. ■■

Dominique Chabasse

Parasitologie-mycologie, Institut de biologie en santé, CHU Angers



Toxoplasmose : faux positif par transmission passive d'anticorps (Ac) anti-toxoplasme

Poster de L. Paris et coll. CHU Pitié Salpêtrière, Paris, France

La détermination du statut immunitaire spécifique contre *Toxoplasma gondii* est essentielle à la surveillance sérologique, délivrer les mesures prophylactiques appropriées pendant la grossesse et évaluer le risque de réactivation chez les patientes immunodéprimées. L'apparition isolée d'Ac IgG

anti-toxoplasme chez une patiente reconnue séronégative constitue un problème diagnostique, on l'explique le plus souvent par la transmission passive d'Ac suite à transfusion sanguine et/ou perfusion d'immunoglobulines polyvalentes : une interférence dans la sérologie toxoplasmique à connaître.

Leishmaniose viscérale de l'enfant

Étude de 164 cas sur 10 ans, S. Cheikhrouhou S., et coll.

Laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU La Rabta, Tunis, Tunisie

La leishmaniose viscérale (LV) est un réel problème de santé publique en Tunisie, surtout en population pédiatrique. Cette étude rétrospective visait à décrire l'épidémiologie et les aspects clinicobiologiques de la LV chez l'enfant. L'étude porte sur 164 cas de LV, diagnostiqués au Laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU La Rabta sur une période de 10 ans (2006-2015). Les prélèvements de sang et de moelle osseuse d'enfants âgés de moins de 16 ans, hospitalisés pour suspicion d'une LV dans divers hôpitaux tunisiens, étaient adressés au Laboratoire pour examen direct et/ou culture et/ou PCR.

Sur 473 prélèvements reçus, 164 (35 %) étaient positifs. L'âge moyen des patients était de 2,6 ans (1 mois-16 ans) avec un sex-ratio H/F de 0,87, ils étaient principalement originaires du gouvernorat de Zaghouan (33 cas), de Béja (29 cas) et Siliana (26 cas).

La durée moyenne des symptômes avant consultation était de 24,7 jours (1-180 jours). La fièvre au long cours était le motif de consultation le plus fréquent (87,3 %). Splénomégalie, hépato-splénomégalie et pâleur cutanéomuqueuse étaient signalées respectivement chez 45,2 %, 40 % et 31 % des enfants. La pancytopenie était présente dans 62 % des cas, une anémie isolée était notée chez 11,1 % des sujets. Le myélogramme réalisé chez 58 enfants était positif dans 42 cas. La PCR sur sang et/ou moelle réalisée chez 106 enfants était positive dans 102 cas. La culture du sang et/ou de moelle sur milieu NNN ou sang de lapin coagulé était positive dans 55 cas.

En conclusion, la LV infantile est à suspecter en cas de fièvre au long cours chez un enfant venant d'une zone d'endémie. Précocité du diagnostic et du traitement ciblé améliorent son pronostic.

Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques de la leishmaniose cutanée en Tunisie

À propos de 1284 cas, H. Hakmouni, et coll. Laboratoire régional d'hygiène, CHU HédiChaker, Sfax, Tunisie

Cette étude rétrospective du Laboratoire d'hygiène du CHU HédiChaker de Sfax, réalisée du 1^{er} janvier 2011 au 31 août 2015, a inclus tous les cas suspects de leishmaniose cutanée. Le diagnostic était posé dans un premier temps sur l'examen direct de frottis dermiques colorés au Giemsa. En cas de négativité, une PCR classique était réalisée.

Sur les 1284 cas suspects, le diagnostic a été retenu dans 694 cas (54 %). La leishmaniose touchait plus de femmes que d'hommes, avec un sexe ratio M/F de 0,82. L'âge moyen était de 33 ans (2 mois à 95 ans). La majorité des patients (43,2 %) venait ou avait séjourné dans la région de Menzel Chaker et Agareb. La lésion était unique dans 65,6 % des cas, 36 % avaient 2 lésions et 40,7 % plus de 3 lésions.

Les membres supérieurs et inférieurs étaient les plus touchés : 576 cas soit 83 %. Le visage était touché dans 174 cas (25 %). D'autres localisations (49 cas) étaient notées : tête, abdomen, dos. En majorité, les lésions sont apparues, selon l'interrogatoire des patients et/ou de leurs parents, 2 mois avant la date de consultation (2 jours à 8 ans). La prévalence saisonnière connaît 2 pics : décembre (24,3 %) et janvier (22,9 %). Le diagnostic était posé par examen direct dans 80,4 % des cas, par PCR pour les autres cas.



Cérémonie d'ouverture. De g. à d. : le Pr H. Louzir, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, M. Saïd El Aydi, ministre de la Santé, le Pr Karim Aoun, coordinateur des Journées et depuis peu Directeur de la Santé



Pause-café
dans le jardin de
l'Institut Pasteur

Technique de l'insecte stérile : innovations et opportunités

Jérémie Bouyer. CIRAD, Montpellier, France

Le développement de résistances des insectes vecteurs de maladies humaines et animales, et l'invasion de nouveaux territoires par des vecteurs exotiques, dans un contexte de réglementation accrue des insecticides autorisés, imposent d'initier de nouvelles méthodes de lutte. Parmi elles la lutte génétique apparaît prometteuse, comme en témoigne le projet d'éradication des glossines au Sénégal.

Dans ce projet, chaque étape a fait l'objet de développements méthodologiques et technologiques applicables à d'autres vecteurs. Les habitats favorables aux glossines sont identifiés par télédétection à partir d'un modèle de distribution permettant de réduire de plus de 95 % la densité des glossines avec

seulement 1,3 à 3,4 pièges/km². Ce même modèle est utilisé pour calculer la densité de mâles stériles à relâcher : 10 mâles stériles au km² si l'habitat est défavorable, 100 s'il est favorable. Ces mâles stériles sont produits et irradiés au Burkina Faso et en Slovaquie, et des conditions optimales de transport par courrier rapide ont été conçues pour assurer leur survie (température de 10 °C notamment). Ils sont ensuite relâchés par voie aérienne et gérés par un système d'information géographique (SIG) qui permet d'ajuster la densité de mâles stériles qu'il est nécessaire de relâcher pour atteindre l'objectif d'éradication.

Cet objectif ouvre des perspectives économiques et environnementales. Une étude

coût/bénéfice *ex ante* en a démontré la rentabilité, il a été primé à l'Expo Milano 2015 dans la catégorie *Meilleures pratiques de développement durable des petites communautés rurales*, comme exemple d'intensification écologique.

Une modélisation a été utilisée pour prédire les distances génétiques entre populations de glossines à leurs limites de répartition en Afrique de l'Ouest, du Burkina Faso au Sénégal. Ce modèle est basé sur des informations obtenues par télédétection et a permis d'identifier d'autres populations de glossines, probablement isolées, qui pourront être ciblées en priorité dans des programmes d'éradication similaires.

Probiotiques dans le traitement de la giardiase

T. Allain et coll. INRA, Jouy-en-Josas. AgroParisTech, UMR1319 Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, France. UMR7245 CNRS, Sorbonne-Universités, Muséum national d'histoire naturelle, Paris. UMR BIPAR, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, INRA, France

Giardia duodenalis est le protozoaire responsable de la giardiase, parasitose intestinale la plus répandue dans le monde, caractérisée par malabsorption intestinale, diarrhées, perte de poids et douleurs abdominales intenses chez l'Homme et nombre de mammifères. Son impact en santé publique et vétérinaire est reconnu, responsable d'importants déficits nutritionnels, en particulier chez le sujet jeune.

L'infection a pour cause l'ingestion de kystes présents dans les aliments ou l'eau contaminée. Infectieux à très faibles doses, ils survivent plusieurs mois dans l'environnement et sont résistants à différents désinfectants. Suite au *dékystement*, les *Giardia*, sous forme trophozoïte, adhèrent à l'épithélium de l'intestin grêle et se répliquent, causant les symptômes.

Cette phase se termine par un nouvel enkystement et l'excrétion de kystes dans les fèces.

Il est désormais établi que certaines bactéries lactiques ont un rôle important dans la protection contre cette parasitose. *Lactobacillus johnsonii* LA1 (LjLa1), notamment, a un rôle protecteur contre la croissance de *Giardia* WB clone 6 sur la gerbille. Dans ce contexte, les auteurs ont récemment identifié plusieurs métabolites actifs, exprimés par LjLa1, responsables de cet effet inhibiteur. Les enzymes produisant ces métabolites ont été clonées en système hétérologue sur *Escherichia coli*, fusionnées à une queue poly-histidine, purifiées et leurs propriétés biochimiques et inhibitrices ont été étudiées.

Les auteurs ont pu montrer qu'elles inhibent la croissance de *G. duodenalis* *in vitro* et *in vivo*

dans un modèle murin de la giardiase (souriceaux OF1 non sevrés). Parallèlement, après avoir effectué un criblage d'environ 40 souches de lactobacilles, selon leur activité anti-*Giardia* *in vitro*, les auteurs ont pu identifier une souche aux effets inhibiteurs comparables à ceux de LjLa1. Puis cette souche bactérienne a été administrée *in vivo* sur le modèle murin de la giardase décrit précédemment. On a observé une réduction de 90 % de la charge parasitaire dans l'intestin grêle des animaux nouveau-nés.

Ces résultats permettent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la giardiase humaine et animale, basées sur l'usage de probiotiques, ou d'enzymes qui en sont dérivées, afin de pallier aux fréquents échecs thérapeutiques actuels.

Otomycoses chez les porteurs d'aides auditives, étude rétrospective 2010-2015

Y. Merad et coll. Unité de parasitologie-mycologie, CHU de Sidi-Bel-Abbès, Algérie

L'aide auditive (AA) chez les sujets sourds ou malentendants expose au risque potentiel d'otite, le caractère occlusif de l'embout de la prothèse (EP) sur le conduit auditif externe (CAE) peut induire une augmentation de la chaleur et de l'humidité et favoriser une infection locale. Cette étude rétrospective de 5 ans sur les otites diagnostiquées en Algérie au CHU de Sidi-Bel-Abbès et à l'EHU d'Oran, inclut des porteurs d'AA, afin d'établir l'incidence des otomycoses dans cette population de sujets de 3 à 86 ans.

Sur 77 porteurs d'AA, 69 portaient des AA contour d'oreille à embout fond de conque, 4 des AA contour d'oreille à micro-embout et 4 des AA intra-auriculaires. La durée moyenne du portage est de 3 ans, 9 patients avouant nettoyer leur embout, 3 seulement avaient des boîtes de rangement mais souillées, les autres plaçaient l'AA dans une poche ou... ailleurs. Après examen ORL, un écouvillonnage du CAE, de l'EP, et une mesure du pH du CAE, puis un examen direct et un ensemencement sur SC, SAC et GS, l'auxanogramme a été utilisé pour les levures. Le pH varie de 4 à 6.

Les signes associés à une mycose sont surtout : prurit, hypoacousie, bourdonnements et otorrhée. Les espèces retrouvées sont : *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*), *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*), *Trichosporon asahii*, *Microsporum canis* chez un enfant en zone rurale avec teigne du cuir chevelu, *Trichophyton rubrum* chez une ménagère ayant une épidermophytie du pied, *Trichophyton mentagrophytes* chez un agriculteur. On note 2 cas de *C. parapsilosis* sur l'EP et le CAE, et 2 affections mixtes avec bactéries *Proteus spp* et *Pseudomonas spp*.

En conclusion l'otomycose du porteur d'AA est fréquente, en été surtout pour le dispositif contour d'oreille à embout fond de conque, elle est retrouvée tant en zone urbaine qu'en zone rurale, elle est soit primitive ou associée à des bactéries. L'examen mycologique est nécessaire, surtout en cas de dermatophytes ou de mycose à distance. Certaines levures sont non seulement retrouvées au niveau du CAE mais également sur l'EP. Il faut donc insister sur l'hygiène de l'AA.

Sécurité et qualité au laboratoire de mycologie

C. Kauffman-Lacroix, parasitologie-mycologie, Poitiers, France

La maîtrise des processus au laboratoire de mycologie médicale assure la qualité de l'examen. Le biologiste doit avoir défini ses besoins précis : une équipe compétente, du matériel et des réactifs performants, une bonne méthode, soit conventionnelle par culture, soit par biologie moléculaire, des locaux adaptés et, bien sûr, un prélèvement assurant une bonne qualité d'échantillonnage, transporté au laboratoire dans des conditions optimales.

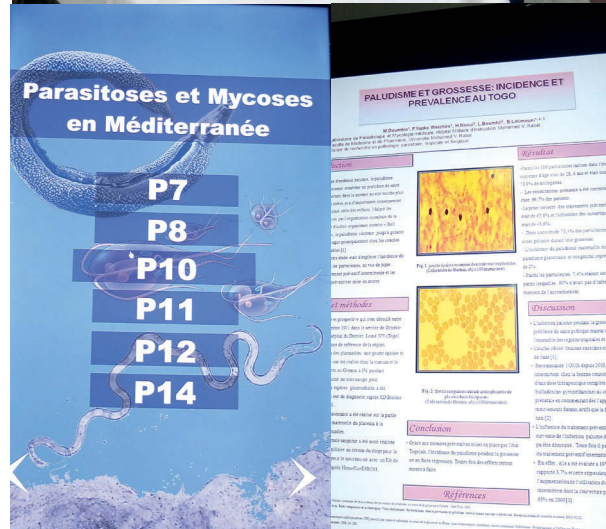
Le biologiste doit procéder à une analyse de risques : identifier les facteurs influençant le résultat ; montrer comment on peut maîtriser ces facteurs d'influence significative ; justifier l'influence non significative de certains facteurs.

Le personnel du laboratoire sera formé aux risques microbiologiques puisqu'il lui arrive d'être exposé à des agents pathogènes infectieux.

La qualité des analyses est surveillée en routine par mise en œuvre de contrôles de qualité internes (souches de référence). La comparaison avec d'autres laboratoires complète les actions à mettre en place grâce à des programmes externes.

Apporter toutes les preuves nécessaires pour que les prescripteurs et les patients aient confiance dans la qualité de l'organisation et des résultats : c'est le but de la norme NF EN ISO 15189 pour les laboratoires de biologie médicale : *Exigences particulières concernant la qualité et la compétence*.

Visite des stands des industriels



Les e-posters Parasitoses et Mycoses en Méditerranée et Paludisme et grossesse

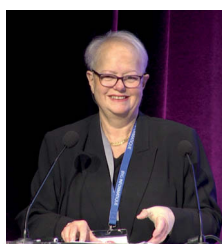
Les animateurs de la session mycologie. De g. à d.: le Pr Ismaël Achir (Algérie), le Pr S. Gargouri (Tunisie), le Pr C. Guiguen (France)



49^{es} Journées de Biologie Praticienne



Les Journées de Biologie Praticienne se sont déroulées du 4 au 5 janvier à la Maison de la Chimie à Paris. Le programme, riche de diversité concerne plusieurs familles de la biologie médicale : immuno-hématologie, biochimie, microbiologie, bactériologie, sérologie infectieuse et parasitaire, parasitologie. Quelques bribes de ces différentes conférences sont ci-dessous rapportées.



Comme d'habitude, Marie-Françoise Gaudeau-Toussaint orna son discours d'ouverture d'une iconographie sur le thème du pont qui lui offrit une panoplie de paraboles dont l'originalité n'enlevait rien aux symboles : jonction, traversée, objectif, rigueur, équipe, destination, humanité...

Tout au long de ces Journées de Biologie Praticienne des conférences transversales (biologie et thérapeutique personnalisée des cancers, problèmes médicaux légaux liés au rôle de conseil du biologiste médical, sécurité et confidentialité des systèmes d'information) côtoyaient 3 sessions DPC : Attitude pratique du biologiste face à une hyper-éosinophilie, Rôle du biologiste pour la maîtrise des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, Exploration biologique de l'ostéoporose en 2015.

Allo-immunisation fœto-maternelle

(Dr Anne François, Paris – modératrice : Marie-Hélène Horellou, Paris)

Le risque encouru par le fœtus est fonction de l'allo-anticorps en cause : l'anti-RH1 et l'anti KEL1 se manifestent dès la fin du 1^{er} trimestre. La prévention de l'allo-immunisation doit être entreprise après la 15^e semaine (pour l'anti-D et l'anti-K) ; après la 20^e semaine pour l'anti-c (risque d'anémie du fœtus).

Les systèmes les plus souvent impliqués sont RH/KEL/FY /JK /MNS. En cas de

transfusion en situation d'urgence vitale à l'aide de PSL O RH1- (toujours RH4+) il faut garder à l'esprit que 25 % des femmes RH1+ sont RH4-. Entre 2011 et 2014, 1 140 anti-RH4 ont été mis en évidence.

Le génotypage de l'ADN fœtal peut être fait à partir de la 12^e semaine pour le RH1 et de la 13^e semaine pour le KEL1. En présence d'un allo-anticorps dangereux pour le fœtus, le titrage doit être pratiqué toutes les deux à 4 semaines. Les anticorps anti-Lewis ne présentent aucun risque, ni pour la mère ni pour l'enfant.

Révolution biologique actuelle dans la prise en charge personnalisée des cancers

(Dr Pierre-Jean Lamy, Montpellier modérateur : Sylvain Loric, Créteil)

Les processus cancéreux relèvent d'une « maladie » de l'ADN : 60 % des anomalies sont transmissibles lors de la division cellulaire.

Le chromosome « Phi » de la LMC est dû à une translocation provoquée par une tyrosine-kinase dont le blocage par l'imatinib (Glivec) empêche cette translocation.



DPC1 Attitude pratique du biologiste face à une hyper-éosinophilie

(Dr Jean-Emmanuel Kahn, Suresnes – modératrice : Chantal Brouzes, Paris)

L'hyper-éosinophilie survient si le taux de PNE est $> 1,5 \text{ G/L}$ ($1500/\text{mm}^3$). Les causes les plus probables sont :

- un médicament (DRESS : *Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms*),
- une parasitose (bilharziose, angilulose, ankylostomiose, filariose, toxocarose, trichinose, distomatose, anisakiose) si le taux d'éosinophiles est $< 1 \text{ G/L}$, penser à l'oxyure ou au taenia.
- une néoplasie (chez une patiente de 18 ans, un taux de PNE $\geq 1,2 \text{ G/L}$, associé à un prurit doit faire penser au Hodgkin ; chez un patient de 63 ans, un taux de PNE $\geq 1,9$, accompagné d'une perte de poids et d'une élévation de la CRP doit faire rechercher un cancer.

La leucémie chronique à PNE est causée par le gène de fusion 1FIP1L1-PDGFRa (tyrosine kinase activée issue d'une délétion de 800 Kb sur le chromosome 4q12 (inhibition par l'imatinib).

- une infection virale (VIH, HTLV1).

L'hyper-éosinophilie est inculpée de cytotoxicité, de dysfonctionnement d'organes, de thrombose provoqués par les granules dont les protéines cationiques ont des propriétés cytotoxiques (impregnation éosinophilique). Les conséquences observées sont diverses et se voient dans toutes les hyper-éosinophilies (manifestations cliniques de la maladie causale) :

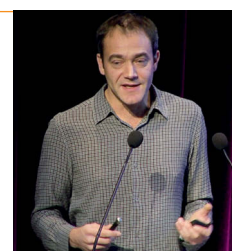
- myocardite,
- thrombose intra VG, embolie systémique,

- fibrose endomyocardique

Le syndrome hyper-éosinophilie (SHE) n'est évoqué qu'en cas d'atteinte d'un

organe liée aux éosinophiles (cœur, tube digestif, système nerveux et peau). Tout taux d'éosinophiles $> 0,5 \text{ G/L}$ persistant, doit être exploré. Ne pas oublier que :

- le Piroxicam (AINS) peut induire une hyper-éosinophilie,
- l'atopie ne donne jamais plus de $1500/\text{mm}^3$ éosinophiles,
- il n'y a pas de relation systématique entre le taux d'éosinophiles et le retentissement,





Discussions entre participants lors de la pause.

➡ Le chromosome 17 porte le gène HER2 et l'Herceptine (Trastuzumab) cible la molécule HER2 surexprimée.

Dans le mélanome, le gène BRAF muté conduit à une auto-activation permanente de la signalisation à laquelle s'oppose le Zelboraf.

Dans le cancer colorectal, le blocage de l'EGFR est obtenu par le Panitumumab et le Cetuximab). Toutefois si la tumeur est KRAS, le blocage par l'anti-EGFR est inutile. La médecine personnalisée a pour principe de base de donner le bon traitement à la bonne personne. Le suivi de la mutation initiale a montré que les métastases, au cours du temps subissent une évolution (modification de(s) mutation(s)). Il est désormais possible d'analyser l'ADN relargué des cellules tumorales circulantes (*circulating cell-free DNA*), d'où l'appellation de « biopsie liquide ».

Récemment, chez un patient atteint d'un CCR traité par anti-EGFR, la mutation sur l'ADNct T790M (EGFR exon19) de résistance au traitement a été mise en évidence.

Problèmes médico-légaux liés au rôle de conseil du biologiste médical

(Dr Didier Legeais, Grenoble
modérateur: Jean Canarelli, Ajaccio)

Un seul mot résume cette présentation: traçabilité +++ (des appels téléphoniques, de l'information du patient – du prélèvement à l'explication des résultats – du prescripteur, de la modification d'une prescription, d'une prestation de conseil, bref de tout ce qui pourrait être reproché au regard de l'absence de la trace écrite... bon courage!

La dengue en 2015

(Dr Rémi Charrel - Marseille;
modérateur Patrick Berche, Lille)

La dengue est due à un arbovirus de la famille des Flaviviridae (genre *flavivirus*). La transmission humaine est effectuée par les moustiques *Aedes* lors d'un repas sanguin. Il existe 4 sérotypes DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4. Il faut se rappeler qu'il n'y a pas d'immunisation croisée. Des infections ultérieures par un autre sérotype sont donc possibles et provoquent une dengue secondaire plus sévère (dengue hémorragique).

Les symptômes surviennent après 2 à 7 jours d'incubation à type de fièvre, céphalées, nausées et vomissements, douleurs articulaires et musculaires et souvent d'une éruption cutanée maculopapuleuse.

Aedes Albopictus s'est bien adapté (mieux que *Aegypti*) aux conditions climatiques tempérées et est retrouvé dans plusieurs départements de la métropole.

Le virus est une particule sphérique enveloppée comportant à sa surface des protéines M et E associées à des lipides, et en interne une nucléocapside C enchâssant le génome viral. Le génome du virus de la dengue est un ARN monocaténaire. Il code les trois protéines structurales (C, E et le pré-curseur de M) et des protéines non structurales dont NS1. La période de virémie va de 2 jours avant le début des signes cliniques jusqu'à environ 7 jours après. Lors d'une infection primaire, les IgM anti-dengue spécifiques sont détectées environ 5 jours après l'apparition des signes cliniques. Le pic survient en deux semaines puis diminue pour devenir

indétectable au bout de trois mois. Les IgG apparaissent vers le 10^e jour et restent détectables pendant plusieurs années.

La détection de la protéine NS1 (Elisa) peut être pratiquée du 1^{er} au 5^e jour après les signes cliniques, mais une réponse négative n'exclut pas le diagnostic de dengue. Les TROD ont une fiabilité variable, voire inacceptable, et inférieure à la méthode Elisa et ne sont donc pas recommandés. La RT-PCR (et la PCR temps réel multiplex) permettent le diagnostic direct dès la phase précoce de la maladie avec identification du sérotype.

En sérologie, la caractérisation d'un taux d'IgG au moins 4 fois supérieur à celui du taux précédent (deux semaines) est très significative.

L'automatisation en bactériologie

(Dr Jean-Louis Galinier, Toulouse –
modérateur: Jean-Louis Gaillard,
Boulogne-Billancourt)

Les raisons de l'automatisation sont multiples:

- baisse des délais de rendu en bactériologie et donc des DMS,
- absence de gain en terme d'ETP suite aux restructurations,
- contraintes pré-analytiques et nombreux formats d'échantillons,
- complexité des processus analytiques,
- multiplication des CIQ et EEQ.

Les conséquences attendues de cette automatisation sont:

- l'organisation des flux plus efficace,
- l'amélioration continue de la qualité,

- la plus value apportée (service rendu – PCR),
- le gain sur les délais (TAT).

À Jo, l'ensemencement et la biologie moléculaire sont les deux principaux acteurs.

- L'ensemencement automatisé doit répondre à la simplification, à l'intégrité de l'échantillon (M4RT, Eswab) et à l'augmentation des performances (différentiation et nombre de colonies, sensibilité). Les automates intéressés sont Previsola, Innova, WASP, Kiestra Inoqua.
- Les méthodes PCR multiplex, ARRAYS offrent une double évolution (technique et automation). Elles devront cependant bénéficier d'une analyse de risque, de programme CIQ et EEQ, de comparaisons de méthodes et de vérification de l'absence de contamination (QUAMIC).

Pour les urines, la cytologie fait appel soit à la cytométrie de flux soit à l'analyse d'image; le but étant d'éviter l'ensemencement d'échantillons négatifs.

À J1, la lecture automatisée des géloses (Kiestra Vision Tool Box, WASPlab) permet l'identification, l'acquisition d'images digitales et... le tri des boîtes privé des allers/retours étuve(s) – paillasse!

Le cahier des charges dans ces projets (ou réalisations) d'automation intéresse différents aspects: l'analyse de risque (5M), les cadences et la modularité, le nombre de sorties en pré-tri, la métrologie, etc. Des indicateurs qualité devront être mis en place (taux moyen de pannes, temps technicien, efficience).

Les gammopathies monoclonales de signification indéterminée

(Dr Olivier Decaux, Rennes
modérateur François Schmitt, Lorient)

Il s'agit des « MGUS » puisque les acronymes anglo-saxons sont devenus incontournables... dont l'hypothèse est formulée lorsque qu'au vu d'un pic à l'électrophorèse le doute s'installe (Kahler, Waldenström, amylose (chaînes légères), cryoglobulines, anti-MAG ?). Une étude américaine a montré que l'occurrence des MGUS était de 3 % chez les patients > 50 ans et elle augmente avec l'âge.

Penser au Kahler, s'il est trouvé: une cytopénie, une cryoglobulinémie, une IRC, une amylose, une atteinte osseuse et une hypogamma polyclonale associée induisant une sensibilité aux infections:



DPC2 Rôle du bactériologiste pour la maîtrise des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques

(Bruno Grandbastien, Lille
modérateur: Michel Simonet, Lille)

En France, les BMR et BHRé (hautement résistantes émergentes) sont respectivement:

- SARM,
- Entérobactéries BLSE,
- *Acinetobacter baumannii* résistant à l'Imipénème (ABRI) ou IMP-S mais résistant à tous les autres ATB.
- *Pseudomonas* TIC (Ticarcilline), CAZ (Ceftazidine), CIP (Ciprofloxacine), IMP (Imipénème).

L'incidence des SARM a baissé de 23 % entre 2009 et 2013 (et de 42 % pour le C-CLIN Nord); la résistance de *Enterococcus faecium* aux glycopeptides (ERG) reste < 1 %.

Le programme national d'actions de prévention des infections associées aux soins (Propias 2015) observe une augmentation des entérobactéries BLSE (β lactamases de spectre étendu) et EPC (productrices de carbapénémase). En 2008 a été publié une multi-résistance de *E. Coli* chez un patient suédois d'origine indienne hospitalisé à New-Dehli (gène plasmidique N-DM1 codant pour une β métallo-lactamase qui confère une multirésistance (fluoroquinolones, aminoglycosides et β lactames).

En 2013, il a été établi que 3,3 % des ECBU de ville isolaient un *E. Coli* BLSE (CTx – M 15).

Les BHRé sont des bactéries commensales du tube digestif, résistantes à de nombreux antibiotiques, selon un mécanisme transférable entre bactéries et émergentes de façon sporadique ou épidémique limitée. À titre d'exemple il s'agit des entérobactéries produc-

trices de carbapénémases (EPC) tel que *Klebsiella pneumoniae* IMP-R (OXA-48 – carbapénémase), *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (ERG).

Ne sont pas des BHRé:

- les bactéries saprophytes comme *A. baumannii* ou *P. aeruginosa*, quelle que soit leur multi-résistance aux antibiotiques qui sont des bactéries non commensales du tube digestif, avec peu de risque de diffusion communautaire, mais une diffusion hospitalière dans les services à risque,
- les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes sans production de carbapénémases;
- les bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et sensible aux glycopeptides. Les entérobactéries produisant des β -lactamases à spectre étendu (EBLSE):
- *Enterococcus faecalis* résistant aux glycopeptides, *E. faecalis* est rarement impliqué dans les épidémies; Il doit être géré comme une BMR.

Le rôle du biologiste est:

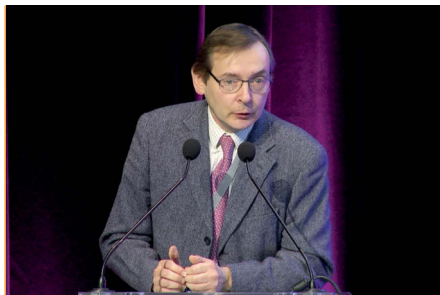
- d'alerter le prescripteur dès la suspicion du caractère BHRé (milieux chromogènes), de l'EOH en cas de confirmation (biologie moléculaire),
- d'apporter un conseil à l'interprétation de l'antibiogramme en relation avec l'infectiologue;
- d'accompagner la gestion d'une crise.

ce sont les critères « CRAB » pour Calcium, IRC, Anémie, lésions osseuses (Bone)

Penser au Waldenström, s'il est trouvé: une cytopénie, un syndrome tumoral, une hyperviscosité sanguine (il n'y a pas de tubulopathie).

Les facteurs biologiques du risque de transformation maligne sont le rapport κ/λ ,

un pic > 15 g/L, un MGUS non IgG; le suivi se fera d'abord à 6 mois, puis tous les ans. Ne pas oublier de tenir compte du terrain contrairement aux préconisations américaines. L'intérêt du dosage des chaînes légères reste à prouver. Ne pas négliger l'importance des informations urinaires (protéinurie et créatininurie exprimées en rapport).



DPC3 Exploration biologique d'une ostéoporose en 2015

(Dr Didier Borderie, Paris – modérateur: Christian Roux, Paris)

Quand évoquer une ostéoporose secondaire ?

En cas de :

- hypercorticisme (corticothérapie et Cushing), la cortisone provoque une OP sans particularité clinique par dépression ostéoblastique et hyperparathyroïdie secondaire à une diminution de l'absorption intestinale de calcium,
- hyperthyroïdie, OP à haut niveau de remodelage avec augmentation des marqueurs du remodelage osseux ;
- immobilisation, ostéogenèse imparfaite ou maladie de Lobstein (ostéop-sathyrose ou maladie des os de verre), hypogonadisme, éthylysme.

Les examens suivants ont pour but d'éliminer une ostéopathie maligne (myélome ou métastases) :

- hémogramme,
- électrophorèse des protéines sériques ;
- CRP ;
- calcémie, phosphatémie, créatininémie avec calcul du DFG ;
- 25(OH) D3 ;
- calciurie, créatininurie – sur les urines des 24 heures

Au cours de l'ostéoporose, ces examens sont le plus souvent normaux. Il n'existe pas de syndrome inflammatoire, ni de gammopathie monoclonale. La découverte d'une hypercalcémie dans ce contexte doit faire rechercher une cause maligne ou une hyperparathyroïdie primitive (avec souvent une hypophosphatémie associée) ; les autres causes d'hypercalcémie ne doivent pas être oubliées (sarcoïdose, surdosage en vitamine D...).

À ces examens peuvent être ajoutés, dans un second temps, en fonction des données de l'examen clinique et des premiers résultats, des dosages biologiques permettant d'identifier une cause secondaire d'ostéoporose :

- cause endocrinienne : PTH (hyperparathyroïdie), TSH (hyperthyroïdie ou surdosage en hormone thyroïdienne

lors d'un traitement), cortisolurie des 24 heures (hypercorticisme), coefficient de saturation de la transferrine (hémochromatose) et, chez l'homme, la testostérone plasmatique (hypogonadisme) ;

- malabsorption intestinale, notamment la maladie coeliaque d'expression parfois infraclinique (voir prestations de conseil (8)) : dans certains cas, on peut être amené à rechercher la présence d'anticorps anti-gliadine, anti-endomysium et anti-transglutaminases ;
- mastocytose.

Il existe des marqueurs biologiques du remodelage osseux capables d'évaluer l'activité de formation osseuse (ostéocalcine, phosphatases alcalines osseuses) ou l'activité de résorption osseuse (téllopeptides du collagène : CTX, NTX). Ces marqueurs sériques n'ont pas leur place dans le diagnostic, ni le bilan initial d'une ostéoporose.

- éliminer une ostéomalacie : dépister une carence en vitamine D qui peut se révéler par l'association d'une hypocalcémie, d'une hypophosphatémie et d'une hypocalciurie. Il existe d'autres causes d'ostéomalacie non carencielles. La seule façon d'affirmer le diagnostic est d'effectuer une biopsie osseuse avec double marquage à la tétracycline.

Faut-il acidifier les urines ?

Cette question est importante et la réponse peut coûter un écart en évaluation Cofrac... 5 mL d'HCl 6N dans le flacon après le recueil surtout en présence de cristaux précipités. Mais l'acidification n'augmente pas la sensibilité du diagnostic...

Calcium total ou calcium ionisé ?

Le calcium ionisé est préférable mais les conditions pré-analytiques (anaérobiose) sont contraignantes. La correction liée à l'albumine n'est valable qu'en cas de calcémie normale, sinon la surestimation n'est pas négligeable.

L'ostéoporose se définit comme une masse osseuse basse associée à une altération architecturale évaluée par ostéodensitométrie (DMO) et s'exprimant par le T-score :

- T-score > - 1 : densité normale ;
- - 2,5 < T-score ≤ - 1 : ostéopénie ;
- T-score ≤ - 2,5 : ostéoporose (dite sévère en cas de fracture).

La DMO est un examen clé mais ne doit s'adresser qu'aux personnes présentant des facteurs de risque.

Cependant,

- Il faut conserver en mémoire qu'une femme ménopausée sur 3 est ostéoporotique (la carence oestrogénique joue, dans les deux sexes, un rôle déterminant dans les mécanismes de la perte osseuse liée au vieillissement. L'arrêt brutal à la ménopause de la sécrétion oestrogénique ovarienne est responsable, chez la femme, d'une accélération du remodelage osseux, notamment de la résorption, ayant pour conséquences l'amincissement des corticales et des travées osseuses, ainsi que la perforation des travées et la diminution de leurs connexions. Ces mécanismes expliquent la baisse de la DMO et l'altération de la microarchitecture corticale et trabéculaire),
- et savoir éliminer les causes ostéoporotiques secondaires malignes et/ou métaboliques (10 à 20 % des ostéoporoses relèvent d'endocrinopathies, de maladies génétiques, de pathologies nutritionnelles, de traitements médicamenteux).

Les examens biologiques d'évaluation sont la NFS, les « bilans » phosphocalcique et hépatique, la créatininémie, la protéinurie des 24 h et la Vit D 25 OH. L'hyperparathyroïdie (PTH) est l'anomalie la plus fréquemment diagnostiquée.

Accréditation en parasitologie – Diagnostic du paludisme

(Dr Sandrine Houze, Paris - modérateur Bernard Fresson, Strasbourg)

3500 cas sont annuellement diagnostiqués en France, dont 10 décès.

L'objectif est à la fois d'effectuer un diagnostic d'espèce, d'évaluer la parasitémie et de suivre l'efficacité du traitement. Le paludisme autochtone (patient n'ayant pas voyagé en zone d'endémie depuis au moins un an) est à déclaration obligatoire.

Le prélèvement doit se faire à tout moment, les renseignements cliniques sont indispensables, la réception doit s'effectuer dans la 1/2 h suivant le prélèvement.

La recherche du parasite sur frottis sanguin (sous PSM II) nécessite l'observation de 200 champs à l'objectif 1 000 en immersion (sensibilité: 100 à 150 parasites/ μ L) et doit s'accompagner d'une goutte épaisse. Penser à associer une numération (anémie et thrombopénie). Deux prélèvements sur EDTA sont nécessaires dont un sera envoyé au CNR (si nécessaire). Le CV de la parasitémie est variable en fonction du nombre de parasites et des formes rencontrées (sans oublier l'observateur...). Ce dernier doit évidemment être habilité (cours et pratique, e-learning – site ANOFEL-, EEQ lues par tous et résultats tracés)

Le résultat de l'examen est à rendre dans les 2 h avec contact tracé auprès du prescripteur. La recherche de l'antigène soluble (TDR) est peu fiable pour *Plasmodium ovale*.

Le pronostic vital est engagé si la parasitémie est $> 4\%$

L'eau utilisée est à pH 6,2 (à vérifier et à tracer). La qualité de la coloration est évaluée à chaque changement de colorant, en s'appuyant sur les éléments figurés du sang (« pseudo-CIQ » avec lames fixées et conservées congelées). Les lames positives et négatives doivent être conservées.

La PCR ne remplace pas les méthodes classiques mais fait partie de la confirmation comme la goutte épaisse.

Système d'information du LBM : exigences en matière de sécurité et confidentialité des données

(M. Gérard Domas-Vasserot, Paris – modérateur: Michel Vaubourdolle, Paris)

Quatre mots gouvernent le système d'information: disponibilité, intégrité, confidentialité et traçabilité.

À l'opposé, c'est le mot « menace(s) » qui importe.

Il s'agit de:

- **menaces internes**: elles sont responsables de 90 % des incidents, par excès de confiance, configurations par défaut, comptes privilégiés en accès libre, droits d'accès permissifs et/ou par ignorance,

- **menaces externes**: soit par piratage du matériel (clé USB, enregistreur de frappe) ou piratage logiciel (e-mail piégé, hameçonnage).

La maîtrise du système d'information passe par deux axes majeurs:

- une gouvernance, une appropriation et des compétences visant à:
 - maîtriser les connexions externes,
 - disposer d'une compétence RSSI (responsable sécurité système information),
 - mettre à jour les outils de protection,
 - ne pas accepter les « cadeaux »,
 - écrire et respecter la Charte d'utilisation.
- une formalisation de la démarche visant à:
 - cartographier le système,
 - effectuer une analyse de risque (Mehari Pro). MEHARI est une méthodologie intégrée et complète d'évaluation et de management des risques associés à l'information et à ses traitements. Les bases de connaissance de MEHARI sont diffusées gratuitement par le CLUSIF sous licence Open Source.
 - disposer de procédures et savoir gérer les non conformités,
 - préparer (et tester) un plan de secours (plan de continuité et plan de reprise),
 - gérer les ressources humaines, contracter avec les fournisseurs et sélectionner des hébergeurs agréés,
 - effectuer les tests de restauration uniquement sur une base dédiée,
 - maîtriser les archivages,
 - quant à la traçabilité... bon courage encore!

Compte rendu (presque) fidèle rédigé par Claude Naudin.

Conférence plénière.



PROGRAMME

vendredi 4 & samedi 5 décembre 2015

Maison de la Chimie
28 bis, rue Saint-Dominique - 75007 Paris

VENDREDI 4 DÉCEMBRE

8 h 30 - Accueil des participants	13 h 00 - Déjeuner
9 h 00 - Ouverture des 49 ^e Journées de Biologie Praticienne Marie-Françoise GAUDEAU-YOISSANT (Directeur Scientifique des Journées de Biologie Praticienne)	14 h 30 - LA DENGUE EN 2015 Reni CHAREL (Montpellier)
9 h 05 - ALLO-IMMUNISATION FETO-MATERNELLE RÔLE DU BIOLOGISTE MÉDICAL DANS LA PRÉVENTION DES COMPLICATIONS Anne FRANÇOIS (Paris) / Modérateur: Marie-Hélène MORELLOU (Paris)	15 h 15 - LES NOUVEAUX MARQUEURS DES SYNDROMES MYELOPROLIFÉRATIFS Anne MÉRAT (Bordeaux) Modérateur: Bernard CHATELAIN (Nîmes)
9 h 50 - RÉVOLUTION BIOLOGIQUE ACTUELLE DANS LA PRISE EN CHARGE PERSONNALISÉE DES CANCERS Pierre-Jean LAMY (Montpellier) / Modérateur: Sylvain LORIC (Caen)	16 h 00 - Pause et visite de l'exposition des matériels et réactifs
10 h 35 - Pause et visite de l'exposition des matériels et réactifs	16 h 45 - L'AUTOMATION EN MICROBIOLOGIE, CRITÈRES DÉCISIONNELS, CONTRÔLES ET PIÈGES Jean-Louis GAILLARD (Toulouse) Modérateur: Jean-Louis GAILLARD (Biologie-Biocom)
SESSION HÉMATOLOGIE 11 h 30 - ATTITUDE PRATIQUE POUR LE BIOLOGISTE FACE À UNE HYPERSINOPHILIE Jean-Emmanuel KAHN (Strasbourg) Modérateur: Chantal BROUDES (Paris)	SESSION BACTÉRIOLOGIE 17 h 30 - RÔLE DU BIOLOGISTE POUR LA MAÎTRISE DES BACTÉRIES MULTI-RÉSISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES Bruno GRANDASTRON (Lyon) Modérateur: Michel SIMONET (Lyon)
12 h 15 - PROBLÈMES MÉDICAUX LÉGAUX LIÉS AU RÔLE DE CONSEIL DU BIOLOGISTE MÉDICAL Didier LEGAIS (Grenoble) / Modérateur: Jean CARARELLI (Ajaccio)	18 h 15 - Fin des conférences de la journée

SAMEDI 5 DÉCEMBRE

8 h 00 - Accueil des participants	10 h 45 - ACCRÉDITATION EN PARASITOLOGIE - LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME Sandrine HOUBE (Paris) / Modérateur: Bernard FRESSON (Strasbourg)
8 h 30 - LES GAMMAPATHIES MONOCLONALES DE SIGNIFICATION INDETERMINÉE Olivier DIECAUX (Reims) / Modérateur: François SCHMITT (Lyon)	11 h 30 - SYSTÈME D'INFORMATIONS DU LBM : EXIGENCES EN MATIÈRE DE SÉCURITÉ ET CONFIDENTIALITÉ DES DONNÉES Gérard DOMAS-VASSEROT (Paris) Modérateur: Michel VAUBOURDOLLE (Paris)
SESSION BIOCHIMIE 19 h 15 - EXPLORATION BIOLOGIQUE D'UNE OSTÉOPOROSE EN 2015 Didier BOKERIE (Paris) Modérateur: Christian ROSE (Paris)	12 h 15 - Clôture des 49 ^e Journées de Biologie Praticienne Marie-Françoise GAUDEAU-YOISSANT
10 h 00 - Pause et visite de l'exposition des matériels et réactifs	



Chaque programme DPC est constitué de 3 étapes :
évaluation des connaissances et des pratiques sur le thème de la session par questionnaire en ligne ; formation prescrite en participant à au moins 2 demi-journées des JP ; questionnaire post-session. Inscription à un tel programme uniquement sur le site SGDP, qui valide l'obligation individuelle.

Informations: Ludvine Claude - éditions-orion@orange.fr - Tél.: 09 71 57 75 65

Abusus non tollit usum

Prestations de conseil (8)

Diarrhée chronique et biologie médicale

Le biologiste médical est souvent confronté à des entretiens privés avec des patients qui ont fait l'effort de surmonter la pudeur et le sujet tabou. Le transit intestinal fait partie de ces délicats entretiens. Nous vous proposons ci-dessous une observation du terrain et ce qu'il apparaît souhaitable d'entreprendre en tant que prestation de conseil auprès du prescripteur qu'en tant que prise en charge biologique et compassionnelle du patient.

Cas clinique

Une femme âgée de 30 ans se présente au laboratoire et demande un entretien avec le biologiste médical. Il ressort de celui-ci qu'elle décrit une augmentation progressive de la fréquence d'émission des selles, depuis 1,5 an, jusqu'à 5 selles très pâteuses/j, parfois même plus liquides avec des épisodes invalidants de diarrhée aqueuse. La question du biologiste concernant d'éventuels voyages lointains obtient une réponse négative (depuis 10 ans), Il ne semble pas y avoir de rectorragies ni de syndrome dysentérique associé. La description des selles indique l'absence de résidus alimentaires. De plus la patiente déclare que ses diarrhées sont réfractaires aux anti-diarrhéiques et qu'elles alternent avec des épisodes de selles normales. Les douleurs abdominales associées s'atténuent après l'émission des selles, et semblent liées à cette modification progressive de la fréquence des selles. La patiente déclare avoir maigri de 4 kg et se sentir agitée et irritable.

À l'examen en salle de prélèvement des aphtes buccaux sont notés par le biologiste.

Les résultats de la prescription initiale sont les suivants : NFS hémoglobine à 116 g/L, ionogramme sanguin et CRP : normaux ; ALAT et ASAT : 1,6 N ; albuminémie : 33 g/L.

Le dialogue entre confrères

Le prescripteur cherche un lien entre la diarrhée et l'hypertransaminémie modérée.

Pour mieux répondre à cet objectif, le biologiste cherche à définir le cadre nosologique.

a) à propos des xénobiotiques

La réponse du prescripteur est « rien à part des anti-diarrhéiques épisodiquement, d'ailleurs non efficaces ».

b) à propos des antécédents

Le dossier consulté indique une tendance à la constipation (il y a 2 ans), une infertilité inexplicée et une fracture de l'avant-bras il y a 2 ans. Dans ses commentaires tracés le prescripteur trouve qu'une tante serait traitée pour une maladie de Crohn iléo-colique.

c) à propos de l'examen clinique

L'abdomen était souple indolore lors de la consultation, la thyroïde palpable et augmentée de volume.

Premières réflexions du biologiste

Ce premier tableau clinique est peu évocateur et contraste avec les déclarations de la patiente lors de l'entretien. De quoi s'agit-il ? D'une diarrhée chronique (selles trop fréquentes (> 3 /j) et/ou trop liquides et/ ou trop abondantes (poids > 300 g/j), évoluant depuis plus de 4 semaines), qui peut relever de 2 types de grandes causes : avec ou sans malabsorption.

En confrontant les données clinico-biologiques, et une recherche active *via* sa bibliographie, le biologiste se propose de formuler,

au prescripteur demandeur d'un conseil, 4 hypothèses diagnostiques parmi :

- le syndrome de l'intestin irritable (SII),
- l'hyperthyroïdie,
- la maladie cœliaque, (**voir encadré 3**)
- la maladie de Crohn,
- la colite microscopique

Mais avant d'appeler le prescripteur... le biologiste se demande quels sont les éléments pour (ou contre) chacune de ces hypothèses ?

• Pour le syndrome de l'intestin irritable (SII)

Femme de 30 ans, avec agitation et irritabilité déclarées, symptômes évoluant depuis 1,5 an, selles non sanglantes ni glaireuses, douleur s'atténuant après l'émission. Ce syndrome constitue l'étiologie la plus fréquente des diarrhées motrices.

• Pour l'hyperthyroïdie

Femme de 30 ans, diarrhée avec selles non sanglantes ni glaireuses, la thyroïde est palpable et augmentée de volume ; ALAT et ASAT : 1,6 N ; perte de poids (- 4 kg), agitation et irritabilité

• Pour la maladie cœliaque

Femme de 30 ans, douleurs abdominales ; 4 selles pâteuses/j ; agitation et irritabilité ; présence d'aphtes buccaux ; antécédent de fracture, de constipation, d'anémie et hypoalbuminémie et infertilité inexplicée.

• Pour la maladie de Crohn

Femme de 30 ans ; une tante traitée pour une maladie de Crohn ; douleurs abdominales s'atténuant après le passage des selles. Perte de poids (- 4 kg) ; aphtes buccaux ; fracture ; anémie et hypoalbuminémie ; ALAT et ASAT : 1,6 N hémoglobine à 116 g/L ; albuminémie à 33 g/L

• Pour la colite microscopique

Diarrhée chronique d'intensité fluctuante, faite de selles parfois liquides, impérieuses et peu sensibles aux ralentisseurs du transit.

Afin de privilégier l'une de ces hypothèses le biologiste médical propose :

- d'évaluer le retentissement de la diarrhée et de rechercher un syndrome de malabsorption : ionogramme sanguin ; NFS ; albuminémie ; calcémie ; PTH ; TP ; Facteur V ; ferritinémie ; cholestérolémie
- de rechercher un syndrome inflammatoire : CRP
- de rechercher l'étiologie : TSH ; AAN ; EPS et dosage pondéral des Ig ; sérologie VIH ; Ac antitransglutaminase IgA ; calprotectine fécale ; parasitologie des selles.

Encadré 1

MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Lors des poussées, les 5-aminosalicylés (5-ASA) sont les anti-inflammatoires prescrits chez la majorité des patients

en raison de leur bonne tolérance.

Les MICI se caractérisent le plus souvent par des douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes parfois sanglantes ou encore une atteinte de la région anale.

Encadré 2

La Calprotectine

La Calprotectine fécale est une protéine présente dans le cytosol des cellules granuleuses. En cas d'inflammation, cette protéine est exsudée dans la lumière du tube digestif et retrouvée dans les selles. C'est un marqueur d'inflammation de la muqueuse du tube digestif.

La Calprotectine fécale est significativement plus élevée chez les patients atteints de MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales). La Calprotectine est négative dans le syndrome du colon irritable.

Prélèvement

1 à 2 g de selles – acheminement rapide au laboratoire puis conservation à +4 °C. Si l'analyse est différée, congeler la

selle à -20 °C. (BHN 160)

Interprétation des valeurs

La valeur seuil de positivité est de 50 µg/g de selles chez l'adulte et l'enfant de plus de 4 ans. Des valeurs comprises entre 50 et 200 µg/g montrent une inflammation de faible intensité pouvant avoir diverses origines (infectieuses, néoplasiques, inflammatoires...) et il est recommandé de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Des valeurs supérieures à 200 µg/g indiquent une maladie de type organique active

(Source: Laboratoire de parasitologie CHRU Lille)

Encadré 3

La maladie cœliaque (MC)

La maladie cœliaque est un syndrome de malabsorption (entéropathie chronique auto-immune) dû à une intolérance au gluten (la gliadine) survenant chez des patients génétiquement prédisposés (95 % sont HLA DQ2 et/ou HLA DQ8). Histologiquement, il s'agit d'une atrophie totale de la muqueuse des villosités intestinales.

Elle est fréquente (prévalence entre 0,5 et 1 %) et revêt des formes atypiques ou frustes avec des symptômes de plus en plus atypiques avec l'âge: aphtes récidivants, ostéoporose, symptômes mimant des troubles fonctionnels intestinaux; elle peut s'accompagner de diverses manifestations extra-intestinales dont l'atteinte hépatique est l'une des plus fréquentes: une hypertransaminasémie chronique inexpliquée associée à des anomalies biologiques peut signer une malabsorption avec anémie ferriprive réfractaire au traitement martial, déficit en folates et vitamine B12 (20-30 %), hypocholestérolémie et hyperparathyroïdie. Des signes neurologiques (ataxie, épilepsie, migraine), et/ou rhumatologiques (polyarthralgie/ostéoporose) et/ou obstétriques (stérilité, aménorrhée, avortements, hypotrophie fœtale) et/ou cardiaques (cardiomyopathie dilatée idiopathique) et/ou cutanéomuqueux (dermatite herpétiforme, alopecie, hypocratisme digital) sont également retrouvés.

Le régime sans gluten permet l'amélioration clinique et histologique mais il ne faut jamais débiter un régime sans gluten avant d'affirmer le diagnostic. En effet, l'arrêt du gluten dans l'alimentation entraîne une diminution, voire la disparition, de la réaction inflammatoire auto-immune; le dosage des marqueurs sanguins peut donc s'avérer faussement négatif. Les patients déficitaires en IgA ont des résultats en tTG IgA faussement

négatifs qui peuvent conduire à un mauvais diagnostic. Si le patient est négatif en tTG IgA et déficient en IgA, un dosage de tTG IgG doit alors être demandé.

Tous les patients ayant des résultats en tTG (IgA ou IgG) positifs doivent ensuite être adressés à un gastro-entérologue.

(Voir encadré 5).

Ne pas oublier le suivi du fait d'un risque de complications si le régime est non ou mal suivi: risques à type de coronaropathies et thromboses veineuses, d'ostéoporose, d'hypofertilité, de colite microscopique et de sprue réfractaire, marquée par une résistance au régime sans gluten, parfois avec une hyperlymphocytose intra-épithéliale monoclonale (sprue réfractaire de type II), véritable lymphome cryptique dont le risque évolutif est le lymphome T invasif, ou de cirrhose et de carcinome HC. La persistance d'une diarrhée chronique malgré un régime sans gluten bien suivi doit faire rechercher une colite lymphocytaire chez un patient avec MC et faire réaliser une coloscopie.

Le dosage régulier des Ac anti-tTG permet de suivre la bonne observance au régime sans gluten (RSG). De plus en plus de patients se mettent au RSG spontanément car ils tolèrent mal les aliments à base de gluten (douleurs abdominales, troubles du transit, ballonnements): on parle alors de sensibilité au gluten, non cœliaque (SGNC) qui n'a pas toutes les caractéristiques de la MC (IgA anti-TG négatifs, IgG anti-gliadine positifs dans 50 %, augmentation moindre des lymphocytes intra-épithéliaux, absence d'atrophie villositaire, HLA DQ2 présent seulement dans 50 %) mais le traitement repose, comme dans la MC, sur le RSG à vie.

Abusus non tollit usum

Encadré 4

DICV

Le déficit immunitaire commun variable (DICV) est un groupe hétérogène de maladies caractérisées par une hypo- γ globulinémie de cause inconnue avec déficit de production d'anticorps spécifiques après immunisation, provoquant des infections bactériennes récidivantes, en général par bactéries encapsulées.

Ce déficit immunitaire est caractérisé par des infections bactériennes à répétition, surtout respiratoires et digestives dominées par la diarrhée, avec ou sans malabsorption, et par une fréquence accrue de tumeurs, de maladies auto-immunes.

Une malabsorption peut s'associer au DICV, le plus souvent insensible au régime sans gluten. L'association à une maladie cœliaque est exceptionnelle.

Le pic de fréquence du DICV se situe entre 20 et 30 ans. En cas de normalité du taux des immunoglobulines G un dosage des sous-classes d'IgG est recommandé car le déficit peut ne concerner que les IgG2, dont la baisse peut passer inaperçue lors d'un dosage pondéral des IgG.

Encadré 5

Ac anti-tTG

La transglutaminase (tTG) est la cible des anticorps anti-endomysium (marqueur spécifique de la maladie cœliaque). La tTG transforme les résidus glutamine en acide glutamique ; la gliadine, riche en glutamine est un substrat privilégié de la tTG et les complexes protéiques en découlant

sont de nouveaux antigènes à l'origine des Ac anti-gliadine et anti-tTG IgA ainsi que d'une activation de lymphocytes T gliadine-spécifiques aboutissant à la réaction inflammatoire (villosités de la muqueuse intestinale).

Les résultats de la prestation de conseil

TSH: 2,5 mUI/L (0.27-4.2); Calcémie corrigée: 2,15 mmol/L (2.20-2.55); PTH: 85 ng/L (15-65); Ferritine 18 ng/mL (15-150); Calprotectine fécale: 25 μ g/g (< 50); TP: 62 %; fact V: 100 % Cholestérol total: 1,2 g/L; Anticorps anti-transglutaminase IgA: négatifs; AAN: négatifs; EPS: hypo-albuminémie et hypo- γ globulinémie: 5,6 g/L (6,0 - 13,5); IgG: 5,4 g/L (N: 7,5 - 15,6); IgM: 1,8 g/L (0,4 - 2,4); IgA: 0,15 g/L (0,8 - 4,5); Sérologie HIV: négative; Parasitologie: présence de Giardia.

Le diagnostic de lambliase est retenu par le médecin, considérant la bonne VPN de la Calprotectine (*voir encadré 2*) dans les MICI (*voir encadré 1*) et la normalité de la TSH. Un traitement par métronidazole pendant 10 jours est entrepris à l'issue duquel les symptômes persistent alors qu'un nouvel examen parasitologique des selles (3 jours de suite) est demeuré négatif.

La patiente est alors adressée à un spécialiste qui prescrit des examens complémentaires dont les résultats sont les suivants:

Ac anti transglutaminase IgG: négatifs

Folates érythrocytaires: 410 pmol/L (780 - 1780); vitamine B12: 201 pmol/L (200 - 660)

La coloscopie est macroscopiquement normale et l'endoscopie digestive objective un aspect « pavimenteux » du duodénum; les biopsies duodénales montrent une atrophie villositaire totale et une augmentation des lymphocytes intra épithéliaux.

La tomодensitométrie abdominale révèle un épaississement des parois de l'intestin grêle et des adénopathies mésentériques.

du fer, facteurs de coagulation vitamino- K dépendant (II, VII, IX, X), hypocholestérolémie, malabsorption du Ca et de la vitamine D (responsables d'une hyperparathyroïdie secondaire), est en faveur d'une maladie cœliaque séronégative.

L'évolution sera favorable sous régime sans gluten avec disparition de la symptomatologie digestive et une repousse villositaire notable sur les biopsies duodénales dès le 2^e mois et totale après un an de régime sans gluten.

Malgré l'absence, ici, d'antécédents d'infections bactériennes ORL à répétition, l'association d'une hypo- γ globulinémie avec diminution des immunoglobulines de classe G et A, dont les taux demeureront inchangés après correction du syndrome de malabsorption, permettra de poser le diagnostic de Déficit Immunitaire Commun Variable (DICV) découvert à l'occasion du diagnostic d'une maladie cœliaque. (*Voir encadré 4*).

Le retentissement de cette maladie est évalué par la recherche de foyers infectieux chroniques, surtout ORL et broncho-pulmonaires, mais aussi urinaires, cutanés, articulaires, neurologiques ou septicémiques. Les agents pathogènes les plus fréquemment rencontrés avec un portage volontiers chronique, sont les bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) ou d'autres germes comme Salmonelles, Shigelles, *Campylobacter jejuni*, Staphylocoque doré, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et des virus (rota et entérovirus), ainsi que *Giardia* et *Blastocystis hominis*. Cependant les examens parasitologiques des selles sont souvent négatifs et le diagnostic ne peut être posé que par les biopsies duodénales.

Enfin, c'est juste notre avis.

Fabrice Guerber

fabrice.guerber@oriade.fr

Claude Naudin

cinaudin@numericable.fr

Conclusion

L'ensemble de ces éléments couplant la présence d'atrophies villositaires à une biologie évoquant une malabsorption (carences en vitamines liposolubles (A, D, E, K), anémie par malabsorption

VIH: le régime PrEP peut s'utiliser comme le préservatif

La prophylaxie pré-exposition pour se protéger de la contamination par le VIH pourrait s'utiliser à la demande – avant et juste après une relation sexuelle – et non pas forcément comme un traitement préventif quotidien chez les HSH. Bref, comme le préservatif, autre moyen de prévention contre le VIH... et autres IST.

Une étude publiée *on line* par le *New England Journal of Medicine* (1^{er} décembre 2015) par le Pr Jean-Michel Molina (Service des maladies infectieuses, Université Paris Diderot) et coll. indique ainsi que les HSH peuvent bénéficier de cet allègement du traitement, utilisé «à la demande» plutôt quotidiennement [sans qu'il y ait de relation sexuelle programmée].

Néanmoins, l'observance du traitement est impérative, dans la mesure où ce traitement proposé en prévention d'une contamination

éventuelle n'offre déjà pas une garantie absolue, ce que cette étude a pu constater chez des sujets qui n'avaient pas respecté à la lettre les conditions d'usage du Truvada®, association fixe de deux antirétroviraux (ART), ténofovir et emtricitabine.

L'étude, qui s'est déroulée en France et au Canada, avait pour objectif de répondre à la question: les sujets à risque peuvent-ils être protégés contre le VIH même s'ils n'utilisent pas le traitement chaque jour, comme il est actuellement recommandé [aux USA et au Canada]? D'où évaluation de la prise avant et après un rapport sexuel considéré «à risque».

Les auteurs ont enrôlé 199 sujets qui recevaient le traitement et 201 composant le groupe placebo. Il s'agissait de sujets HSH ou bisexuels à risque d'infection à VIH, qui prenaient un comprimé de 2 h à 24 h avant le rapport et après celui-ci. L'observance n'était pas parfaite, notent les auteurs: si les participants ont pris leurs comprimés

en moyenne 15 fois en un mois, l'analyse a montré que seulement 43 % les prenaient correctement chaque fois que nécessaire [avant et après un rapport].

Soit 57 % de mauvaise (insuffisance de comprimés utilisés) ou non observance (aucun comprimé utilisé)! Néanmoins Les résultats ont permis d'estimer que le schéma de traitement proposé réduit le risque d'infection de 82 à 86 %.

Selon J.-M. Molina, ce schéma de traitement peut constituer une alternative à l'usage du préservatif chez les sujets qui ne peuvent [ou ne veulent] pas l'utiliser régulièrement. Par ailleurs, ce schéma de traitement validé peut avoir une incidence financière sur le coût total du traitement que ce soit aux USA (1 300 \$/mois) et – bientôt – en France, comme récemment annoncé par le ministère de la Santé. ■■

J.-M. M.

Source: HealthDay News.



QUAND LE PALUDISME TUE ENCORE TOUTES LES MINUTES, IL EST TEMPS DE CHANGER DE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE

Révolutionnez la précision diagnostique au laboratoire avec les performances du test moléculaire *illumigene*® Malaria.

Sensibilité analytique 20.000x supérieure aux méthodes conventionnelles

▶ Bénéficiez d'une offre d'adoption exclusive sur www.meridianbioscience.eu/contacts



1. *illumigene*® Malaria Package Insert, SN11102 | 2. Okell, Lucy C., et al. "Submicroscopic Infection in Plasmodium falciparum –Endemic Populations: A Systematic Review and Meta Analysis." *The Journal of Infectious Diseases* J INFECT DIS 200.10 (2009): 1509-517. | 3. Abba, Katharine, et al. "Rapid Diagnostic Tests for Diagnosing Uncomplicated Non-falciparum or Plasmodium Vivax Malaria in Endemic Countries." *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2014).

BRÈVES

Un combo contre le VHC

Le laboratoire Abbvie (ex-Abbott Pharma) a annoncé que la FDA a accepté d'examiner le dossier de Viekira Pak®, destiné au traitement de l'infection chronique à virus de l'hépatite C (VHC), y

compris chez les patients avec cirrhose non décompensée. Viekira Pak® est une association fixe, un « combo » (combinaison) d'ombitasvir, de paritaprévir et de ritonavir utilisé avec le dasabuvir. Il peut être utilisé avec ou sans ribavirine (antiviral), et est déconseillé en cas de décompensation de la cirrhose. La posologie conseillée est de trois comprimés quotidiens, à prendre au moment d'un repas, avec ou sans ribavirine, comme l'a proposé la FDA. Cette nouvelle posologie, près d'un an après le lancement de Viekira Pak®, s'adresse aux sujets porteurs du VHC de génotype 1. Pour Michael Severino, responsable scientifique R & D, Abbvie, il s'agit d'offrir une option de traitement optimal de l'hépatite C. La révision de la posologie avait été exigée par la FDA en raison d'un risque d'atteintes hépatiques apparu lors d'études post-marketing. La notice du produit a été modifiée en conséquence.



Ebola, paludisme, même combat

Rechercher le paludisme chez des patients explorés par ailleurs lors d'une épidémie de maladie à virus Ebola (MVE) est faisable et sûr, selon des données rapportées dans une étude du *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), l'une des agences sanitaires spécialisées des NIH. L'étude rappelle que le paludisme est un sujet majeur de santé publique avec des milliers de cas et des milliers de morts, dit le NIAID. Du fait que les symptômes du paludisme et de la MVE se chevauchent (*overlap*) et sont difficiles à évaluer séparément au cours d'un triage de cas lors d'une flambée de cas de MVE en Afrique de l'Ouest, une équipe du NIAID d'un centre de diagnostic de la MVE au Liberia a évalué la faisabilité des diagnostics simultanés sur le même échantillon-patient entre octobre 2014 et mars 2015, à partir de 1 058 patients suspectés de MVE. Au total, 259 MVE, 243 paludismes et 47 co-infections ont été diagnostiqués, confirmant la valeur de la double recherche.

Contre le cancer agressif, la révolution photo-immunothérapeutique

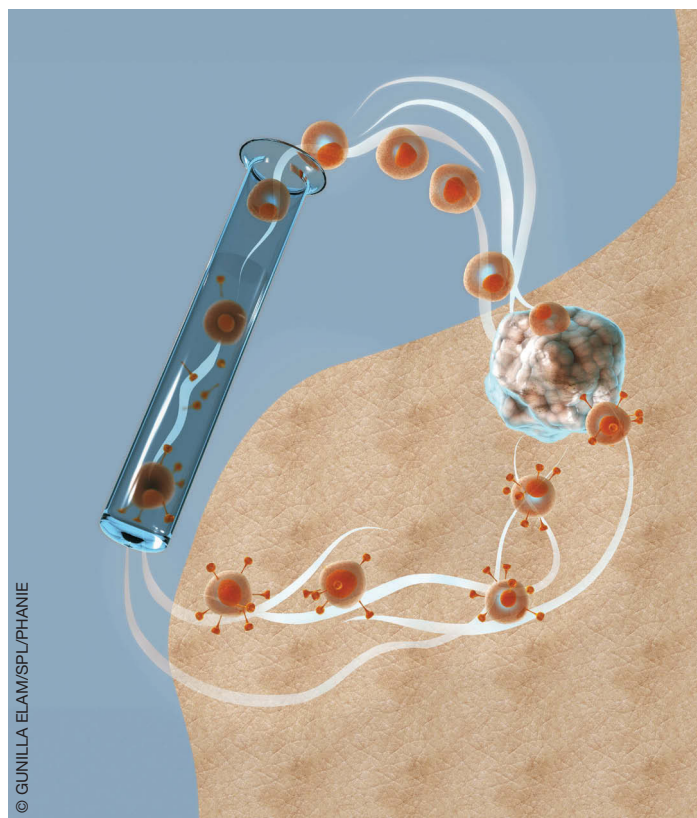
Une nouvelle approche associant immunothérapie et photosensibilisation à la brémachlorine dans le cancer, testée au Centre médical de l'Université de Leyde (LUMC, Pays Bas), fait état de l'efficacité de l'immunothérapie combinée à la photodynamie (PDT) pour éradiquer les tumeurs.

Cette approche permet la destruction des tumeurs locales et une forte réponse immunitaire systémique. Les conclusions d'une étude préliminaire ont été publiées dans *Clinical Cancer Research* du 6/11/2015. « D'autres études précliniques sont en préparation dans le but d'obtenir l'autorisation d'utilisation en clinique dans l'Union européenne », précise le Pr Ferry

Ossendorp, investigateur principal, associé au Dr Jan Willem Kleinovink (Département d'immunohématologie et transfusion sanguine, LUMC) et au Dr Clemens Lowik, (CHU Érasme, Rotterdam).

L'équipe néerlandaise a associé deux traitements confirmés, la PDT et l'immunothérapie, contre les tumeurs agressives. La PDT utilise un photosensibilisant, qui se combine avec l'oxygène et la lumière et rend les tumeurs plus vulnérables au système immunitaire. « Nous avons même constaté la disparition des tumeurs distales sur certains animaux », indique le Pr Ossendorp. Le photosensibilisant était ici la brémachlorine, agent non toxique dérivé de la chlorophylle, qui capte l'énergie lumineuse à des fins thérapeutiques. L'immunothérapie retenue était basée sur un vaccin peptidique activateur des lymphocytes T.

L'étude de Leyde a ciblé des formes agressives de lymphome et de cancer du col de l'utérus, et a montré que la combinaison brémachlorine-PDT ralentit significativement la croissance tumorale sur les animaux-tests. Par ailleurs, l'administration de la PDT combinée à un vaccin peptidique



a favorisé la guérison complète d'un tiers des animaux, avec développement d'une immunité contre le même type de cancer. « Enfin, le traitement combiné des tumeurs primaires a entraîné l'éradication des tumeurs secondaires distantes ou des métastases. Ce constat original exige une étude plus approfondie », précise le Dr Ossendorp, qui rappelle que les métastases sont la principale cause de mortalité par cancer.

Dans *Clinical Cancer Research*, les chercheurs soulignent que la stratégie photo-immune offre une nouvelle option de traitement contre le cancer avancé. La brémachlorine est approuvée pour usage clinique en Russie (sous le nom de radachlorine) et en Corée du Sud depuis 2006. Les études précliniques actuelles aux Pays Bas visent à obtenir son approbation en Europe en vue d'études cliniques chez les patients cancéreux dans l'Union européenne pour obtenir l'homologation de ce traitement original. ■■

J.-M. M.

Source: PR Newswire.

Traitement du lupus: les Français innovent

Une équipe d'immunologie du Laboratoire d'Immunopathologie et chimie thérapeutique du CNRS à Strasbourg (Sylviane Muller et coll.) a développé un nouveau traitement, non immunosuppresseur, du lupus, le Lupuzor®, un peptide déjà testé positivement en phases 1 et 2 par ImmuPharma-France. Une étude de phase 3 en cours aux USA, puis en Europe devrait ouvrir sur l'AMM pour ce premier traitement spécifique du lupus.

Le lupus, maladie auto-immune chronique, concerne plus de 5 millions de patients dans le monde, (environ 30 000 en France), dont 90 % de femmes. Ses auto-anticorps pro-inflammatoires visent divers organes, avec un large éventail de symptômes : lésions cutanées, arthralgies, thromboses,

poussées psychotiques... On ne dispose que de traitements palliatifs, la plupart non spécifiques, tels corticoïdes et immunosuppresseurs, qui affaiblissent le système immunitaire. S'ils tempèrent l'agression auto-immune, ils sensibilisent les patients à des multi-infections.

L'équipe de Sylviane Muller, lauréate 2015 de la médaille de l'innovation du CNRS, a développé une famille de peptides qui *corrigent* le dysfonctionnement du système immunitaire, tel le P140, qui a permis de retarder le développement du lupus sur un modèle animal (souris), sans abaisser la capacité anti-infectieuse du système immunitaire. Les études cliniques de phase 1 et 2 ont été réalisées par ImmuPharma-France, qui a une licence exclusive sur cette famille de peptides. Dans les essais de phase 2, la maladie a régressé chez 62 % des patients après 3 mois de traitement.

Suite à ces succès, ImmuPharma-France a lancé l'étude de phase 3, dans laquelle le candidat-médicament sera administré en double aveugle une fois par mois en sous-cutané, à raison de 200 µg par injection, pour un traitement d'un an, chez 200 patients dans 45 centres : 10 aux USA et 35 en Europe. Le recrutement devrait se terminer mi-2016 et les résultats sont attendus fin 2017.

Si les résultats confirment ceux de la phase 2, le Lupuzor® pourra être commercialisé et occupera alors une position centrale dans le traitement des patients atteints de lupus, selon le CNRS. La molécule pourrait concerner d'autres pathologies auto-immunes chroniques tels syndrome de Sjögren ou maladie de Crohn. Les études sur ce point se poursuivent dans le laboratoire de Sylviane Muller. ■

J.-M. M.

Source: CNRS Communication.



GAMME DIMA

Dépistage de stupéfiants



TESTS IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES SUR CASSETTE POUR LA DÉTECTION DE DROGUES DANS LES URINES

- Coffrets mono ou multi-paramétriques
- Nombreux paramètres et combinaisons
- Différents seuils de détection



Biosynex (France)

Lire attentivement les instructions figurant sur l'étiquetage et/ou les notices des réactifs.



FUMOUZE
DIAGNOSTICS

Tél. : 01 49 68 41 48

Fax : 01 49 68 43 22

www.fumouze.com

BRÈVES



© vege

L'Europe contre le VIH

Une nouvelle initiative pour accélérer la recherche en vue du développement d'un vaccin efficace contre le VIH a débuté sous les auspices de la Commission européenne : l'European AIDS Vaccine Initiative (EAVI2020), qui sera placée sous l'autorité de l'*Imperial College* de Londres, fédérant les scientifiques de 22 institutions de toute l'Europe... et des États-Unis. Connaissances et expertise seront mises en commun pour développer un nouveau candidat-vaccin, avec comme objectif que ce vaccin accède aux premiers tests chez l'homme dans les cinq ans. Pour le Pr Robin Shattock (Département de médecine, *Imperial College*), coordinateur d'EAVI2020, développer un vaccin actif contre le VIH représente « *l'un des plus grands défis biologiques d'une génération* ». C'est une tâche que ne peuvent réaliser seuls ni un groupe, ni une institution. Ce projet fédérateur multidisciplinaire devrait permettre d'avancer plus rapidement, car il associe biologistes moléculaires, immunologistes, virologues, biotechniciens et cliniciens, apportant chacun les plus récentes connaissances de leur spécialité.

Source : *Infectious Disease Advisor*.



© ChicoDodiFC

La FDA et le don de sang des MSM

Fin décembre, la *Food & Drug Administration* a publié la version finale de ses recommandations concernant la sécurité du don du sang, qui permet aux hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (MSM) de faire un don si leur plus récent contact sexuel a eu lieu au moins un an plus tôt. En relation pour une large part avec le développement de tests de dépistage du VIH plus sensibles, il s'est manifesté dans la littérature sociale et scientifique un appel pour que soit reconsidérée (*revisited*) la politique d'accès au don du sang, dont les règles ont été établies il y a plus de trois décennies, en particulier pour les MSM, souligne la FDA. Celle-ci estime que les preuves disponibles de nos jours soutiennent plus fortement un changement de la restriction indéfinie [au don du sang] pour la règle nouvelle d'un an pour les MSM (HSH en France), sans que soit remis en cause le maintien ou l'amélioration de la sécurité du don de sang, qui fera l'objet d'un suivi attentif spécial. La nouvelle règle ne s'applique ni aux travailleurs du sexe, ni aux toxicomanes par voie veineuse.

Source : FDA. www.fda.gov



© science photo

Cytomégalovirus: un vaccin pour les receveurs de cellules souches

City of Hope, un centre américain de recherche et de traitement du cancer vient de rapporter les résultats de la phase 1b d'un test clinique de son candidat-vaccin contre le cytomégalovirus (CMV), CMVPepVax, dont les conclusions se résument ainsi : sûr, efficace chez les patients recevant une transplantation de cellules souches (stem cells).

Ce vaccin innovant est destiné à combattre les infections à CMV, causes majeures de complications chez les patients ayant reçu des cellules souches. Si des antiviraux peuvent réduire chez eux le risque d'infection à CMV, ils ne sont pas exempts d'effets toxiques et peuvent favoriser des infections opportunistes bactériennes ou fongiques.

CMVPepVax stimule l'immunité anti-CMV et a montré son efficacité et sa sécurité chez les 36 patients-cibles, selon les résultats préliminaires publiés en ligne dans le *Lancet Haematology* du 23 décembre 2015, résultats qui ouvrent la voie à un essai clinique de phase 2 plus large pour confirmer l'efficacité : cet essai en double aveugle contre placebo devrait, en collaboration avec l'Université du Minnesota, concerner 96 patients au moins.

Lors de la phase 1b, les patients recrutés devaient recevoir des cellules souches pour leucémie ou lymphome. La moitié de ces patients initiaux a reçu le vaccin CMV à 28 et 56 jours après la transplantation de cellules souches, tandis que les autres patients poursuivaient le traitement standard de leur pathologie.

Au cours du suivi de ces premiers patients, l'équipe de City of Hope a constaté de hauts niveaux de cellules T protectrices contre le CMV, l'incidence de réactivation du virus était moindre et les besoins en antiviraux étaient bas, comparés au groupe de patients non vaccinés. CMVPepVax génère ainsi des lymphocytes T spécifiques du CMV permettant la maîtrise de la virémie chez les patients. Pour les chercheurs du centre anticancéreux (Corinna La Rosa) Ryotaro Nakamura, Don J. Diamond et coll.), la réponse au vaccin reproduit en quelque sorte la réponse attendue habituellement d'un système immunitaire *sain*. C'est ce qu'on attend logiquement d'un vaccin ! L'équipe de City of Hope semble avoir constaté que les patients ayant reçu le vaccin avaient une incidence moindre de rechute de leucémie et de risque de décès. À prendre avec recul avant d'avancer un éventuel effet positif dû au vaccin ! Le vaccin anti-CMV n'a pas produit d'effets indésirables et les complications ont été moindres dans le groupe des vaccinés, qui ont récupéré, selon les auteurs, une *immunité plus robuste* que leurs comparateurs. Ils estiment qu'à l'avenir CMVPepVax pourrait être utile également chez des patients recevant un greffe d'organe ou porteurs de maladies immunodéficientes... et dans toute situation où le CMV pose un problème de santé... ■■

J.-M. M.

Information : www.cityofhope.org. City of Hope, fondé en 1913, est un pionnier de la transplantation médullaire et de génétique.

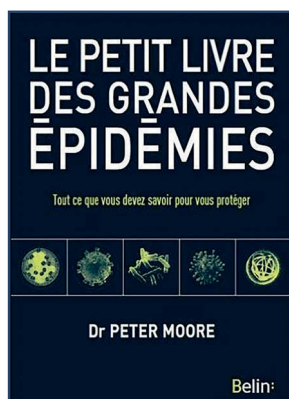
LIVRES

Le petit livre des grandes épidémies

Tout ce que vous devez savoir pour vous protéger

Pour ce petit livre bien conçu, argumentaire en forme de QCM : quels sont les trois plus grands tueurs de l'histoire de l'humanité : guerre, famine ou catastrophes naturelles ? Non : grippe, peste et sida. Aujourd'hui, nous explique-t-on, notre monde moderne favorise la prolifération des maladies, voire l'émergence de nouvelles maladies tel Ebola ou la réapparition de *vieilles maladies (sic)*, telle la dengue. Un livre simple et concis, qui présente 50 maladies infectieuses parmi les plus virulentes, selon un classement style fiches et une présentation facilitant lecture et compréhension, permettant de répondre rapidement à

la recherche d'informations concises, ou pour répondre à un interlocuteur



curieux (lycéen, étudiant, patient). Dans chaque fiche on trouve des informations sur l'histoire de chaque maladie, sa répartition dans le monde, les troubles qu'elle provoque, les traitements possibles et des conseils pratiques. Travail journalistique : l'auteur, membre honoraire du Trinity College

de Bristol, est journaliste médical et auteur de livres de santé et de science.

Peter Moore. Editions Belin. 144 p.
www.editions-belin.com

Risque chimique au laboratoire

Guide à l'usage des médecins du travail et des manipulateurs

Ce guide pratique permet aux médecins du travail et de prévention d'agir face au risque chimique. Il expose et clarifie les réglementations en matière de prévention du risque

chimique indispensables à la prise de décision. La plupart des chapitres traite de questions pratiques : que faire en cas de pollution de l'atmosphère du laboratoire ou toxicité pour la reproduction. La prévention chez la femme enceinte est explorée dans un chapitre qui comporte des repères de physiologie pour les sujets exposés et les médecins, et des informations réglementaires pour les employeurs. De nouveaux outils sont proposés pour la réalisation de l'Attestation d'Exposition Antérieure aux agents chimiques dangereux par les médecins du travail (elle n'est plus obligatoire depuis 2012). Ainsi un modèle

de cette attestation préremplie et un aide-mémoire de toxicité de 40 substances courantes en laboratoire de biologie devraient aider au suivi médical post-exposition et post-professionnel du personnel. Faire un lien entre une maladie, un cancer et une exposition passée, même faible, nécessite une information et une traçabilité rigoureuse des expositions chimiques pour la reconnaissance et l'indemnisation en maladie professionnelle. Bien que destiné particulièrement au suivi médical du personnel de laboratoire de chimie ou de biologie, ce guide est utile à la prévention du risque chimique sur le lieu de travail public ou privé. L'auteur, neuro-endocrinologue, est médecin du travail et exerce à la Ville de Paris, après une longue activité en médecine du travail interentreprises, et en médecine de prévention à l'INSERM et à l'École polytechnique. ■■

Isabelle Lagny. 2^e édition, mise à jour juridique. 190 p. www.editions.polytechnique.fr

AGENDA

février-juin 2016

JIB 2016

22-24 juin 2016

Paris/Porte de Versailles
www.jib-sdbio.fr

SNBH

22-24 juin 2016

Paris/Porte de Versailles
www.snbh.asso.fr – www.acnbh.org

**International congress
on anti-cancer treatment**
2-4 février 2016

Paris
www.icact.fr

Assises de génétique humaine
3-5 février 2016

Lyon
www.assises-genetique.org

**Rencontres de l'Institut national
du cancer**
4 février 2016

Paris
www.rencontresinca.fr

CODIA/Forum Cardio-Diabéto
16-17 février 2016

Paris
codia-forum.com/fr

**Génétique en médecine légale
(genetics in forensics)**
14-15 mars 2016

Londres
www.forensic-genetics-congress.com

**Journées francophones
d'hépatogastro-entérologie
et oncologie digestive**
17-20 mars 2016

Paris
www.jfhod.fr

Forum Labo & Biotech
30-31 mars 2016

Lyon
www.forumlabo.com

**Assises de sexologie
et de santé sexuelle**
7-10 avril 2016

Reims
www.assises-sexologie.com



Un biphosphonate pour limiter le vieillissement des cellules souches

En limitant l'accumulation des cassures de l'ADN et en favorisant leur réparation, le zolédronate protégerait un certain type de cellules souches, les cellules stromales mésenchymateuses, des effets délétères de l'irradiation et du vieillissement.

Une étude, récemment publiée par Juhi Misra et coll. dans la revue spécialisée *Stem Cells*, propose que le zolédronate, un biphosphonate couramment utilisé en clinique pour inhiber la résorption osseuse dans le traitement de l'ostéoporose ou de pathologies associées à une destruction du tissu osseux (telles les métastases osseuses), protégerait un certain type de cellules souches, les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), des effets du vieillissement.

Ces CSM sont des cellules souches dites «multipotentes» car elles sont capables de se différencier en divers types cellulaires dont les cellules des tissus de soutien et du tissu graisseux ainsi que les cellules à l'origine du cartilage et de l'os. Malgré leur caractère souche, elles perdent leur capacité de prolifération lorsqu'elles sont cultivées pendant plusieurs passages *in vitro* ou lorsqu'elles sont soumises à des irradiations et ceci est en partie lié à une accumulation des dommages à l'ADN.

Les auteurs de l'article de *Stem Cells* étaient partis de l'observation surprenante selon laquelle le traitement par l'acide zolédronique augmentait de façon significative la survie

de patients traités pour des fractures de la hanche (Lyles et coll., *NEJM* 2007; 357) ou de souris atteintes d'une affection caractérisée par un vieillissement accéléré, la progéria de type Hutchinson-Gilford (Varela et coll., *Nature Medicine* 2008; 14). Ces éléments avaient alors incité les auteurs à rechercher si l'une des principales voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ne pourrait pas être une cible potentielle de l'acide zolédronique. Par l'intermédiaire d'expériences *in vitro* réalisées sur des CSM provenant de la moelle osseuse de sujets sains jeunes (2 à 15 ans), ces chercheurs avaient mis en évidence que le zolédronate ajouté aux cultures protégeait les CSM des dommages à l'ADN créés par une culture à long terme et améliorait leur survie et leur prolifération, tout en préservant leur capacités à se différencier.

Le zolédronate favorisait également les processus de réparation de l'ADN (mis en évidence par des tests de type comet mesurant les cassures de l'ADN), après une irradiation (1 à 7 Gy) des CSM *ex vivo*. Ils ont ensuite montré que l'effet du zolédronate sur la réparation de l'ADN passait par l'inhibition de la voie du mevalonate et, en particulier, via l'inhibition de la signalisation AKT/mTOR/FOXO3A, en aval de cette voie. En effet, l'inhibition de l'activation de mTORC2 par le zolédronate conduisait à une diminution de la phosphorylation d'AKT et à la translocation nucléaire de FOXO3A qui, à son tour,

augmentait la phosphorylation d'ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), une protéine-clé de la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Les auteurs ont ensuite vérifié sur la souris que le zolédronate avait la capacité de protéger *in vivo* les CSM des effets délétères de l'irradiation (3 Gy).

Compte tenu de la bonne tolérance de la molécule, les auteurs concluent leur étude en suggérant que le zolédronate pourrait présenter un intérêt dans le traitement des effets secondaires de l'irradiation chez les patients atteints de cancer, mais également dans les protocoles d'expansion des CSM à visée de thérapeutique. Le travail ayant été réalisé sur des cellules de sujets jeunes sains, il restera néanmoins à étudier l'effet du zolédronate sur les cellules de sujets âgés et, qui plus est, de sujets âgés malades. Par ailleurs, en protégeant les CSM des effets du vieillissement et en augmentant leur durée de vie en culture, il n'y aurait qu'un pas à faire (ou à ne pas faire ?) pour anticiper un effet du zolédronate sur le ralentissement du vieillissement des cellules souches... Quels qu'en seraient le retentissement au plan biologique et médical, l'augmentation de l'espérance de vie reste un véritable challenge sur le plan sociétal et économique; mais un tel débat n'est pas l'objet de cette rubrique! ■■

Misra J, et coll. *Stem Cells*. 2015 Dec 17. doi: 10.1002/stem.2255. [Epub ahead of print]

Le test qui écarte le risque d'infarctus et soulage les urgences

Dans un article du *Lancet*, A.S.V. Shah (Université d'Édimbourg) utilise un test sanguin pour évaluer rapidement le risque d'infarctus dans une cohorte de 6304 patients admis aux urgences pour douleur thoracique. Ce test est basé sur un dosage du taux de troponine I ultrasensible (Tni us), protéine intervenant dans la contraction cardiaque et qui, avec la troponine T (Tnt us), est l'un des marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques des dommages myocardiques résultant d'un infarctus.

Une troponine < 5 ng/L peut identifier un patient avec douleur thoracique mais à faible risque d'infarctus ne justifiant pas l'admission.

Dans une première partie du travail, les chercheurs ont étudié 4 870 patients. Sur les 3 799 patients qui ne présentaient pas de signe d'infarctus à l'admission, 61 % (2 311 patients) présentaient un taux de troponine inférieur à 5 ng/L. Ces patients avaient un très faible risque d'attaque cardiaque dans le mois suivant leur admission (valeur prédictive négative de 99,6 %) et pouvaient donc rapidement sortir des services d'urgence. Cette valeur prédictive est indépendante de l'âge, du

sexe, du risque cardiovasculaire et des antécédents.

Le seuil de 5 ng/L a été ensuite validé sur deux cohortes indépendantes de 1 434 patients au total. De la même façon, les auteurs montrent que 56 % des patients présentaient des taux inférieurs à ce seuil avec une valeur prédictive négative de 99,4 %. De plus, un an après l'examen, ces patients présentaient toujours un plus faible risque d'infarctus que ceux dont le taux de tropo-

nine était initialement supérieur ou égal à 5 ng/L, ce qui démontre la fiabilité du test. Compte tenu de la constante augmentation du nombre de patients hospitalisés pour douleur thoracique, ce test représente une avancée pour le patient, mais aussi pour l'hôpital en termes d'économies substantielles.

Malgré l'intérêt évident du test pour trier rapidement les patients à faible risque d'infarctus, des points particuliers méritent d'être validés, comme par exemple son seuil de sensibilité

pour les patients arrivant très précocement aux urgences, et sa reproductibilité entre différents laboratoires hospitaliers. Il sera également nécessaire de valider son efficacité à long terme en le combinant à d'autres modes d'évaluation du risque d'infarctus, ceci dans le cadre d'un suivi clinique de ces patients. ■■

Shah AS et Coll. *Lancet* 2015 Oct 7. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00391-8.

Le cancer, fruit du *hasard*

Deux articles publiés en 2015 dans les revues *Science* et *Nature* discutent de l'intervention du hasard dans le développement des cancers, à grand renfort de statistiques et de modèles mathématiques.

L'année 2015 aura été source de controverses dans le domaine de la cancérologie. Deux publications parues respectivement en tout début et toute fin d'année dans des titres parmi les plus prestigieux de la littérature scientifique, les revues *Science* et *Nature*, ont relancé la polémique sur le rôle des causes intrinsèques vs extrinsèques dans le développement des cancers. De façon intéressante, en partant des mêmes observations de base, les auteurs de ces deux articles arrivent, grâce à des analyses statistiques et des modèles mathématiques complexes, à des résultats quasiment opposés, impliquant, ou non, le hasard comme cause majeure de la plupart des cancers.

Partant de l'hypothèse de base que le nombre de division des cellules souches serait corrélé au risque d'apparition d'un cancer, l'équipe de Tomasetti et coll. (*Science*, 2015) démontre que la « bad luck » (malchance) serait la principale responsable de la survenue des cancers, alors que l'équipe de Wu et coll. (*Nature*, 2015) implique d'autres facteurs, parmi lesquelles l'hérédité et l'environnement, comme causes majeures du processus malin.

Sans rentrer dans le détail des faiblesses méthodologiques et dans l'interprétation des résultats à l'origine de cette polémique, et sans taire le fait que ces deux études excluent les cancers du sein et de la prostate, dont la fréquence aug-

mente de manière inquiétante, ces deux articles sont essentiels, car ils révèlent la complexité physiopathologique du processus cancéreux. En effet, qu'elles soient malignes ou non, les cellules, et plus particulièrement les cellules souches, se trouvent dans un environnement cellulaire et moléculaire qui participe très finement à la régulation de leur prolifération et différenciation. Ce microenvironnement est dépendant de l'environnement tissulaire, lui-même sensible à l'inflammation, du système immunitaire, du stress oxydatif... résultant des infections, du vieillissement, des traitements et des multiples agressions extérieures (pollution, alimentation, alcool, tabac, radiations...).

Question: quelle serait la part du hasard et de la nécessité du processus tumoral?

Ainsi, il est peu probable que la transformation maligne d'une cellule par des mutations acquises lors de divisions successives soit uniquement le fruit du hasard. Il semble beaucoup plus vraisemblable que cette transformation soit dépendante, au moins en partie, de l'environnement cellulaire au sens large. Que cet environnement délétère exerce une pression sélective sur l'émergence/développement du clone malin ou qu'il soit à l'origine de cette transformation, la question reste ouverte pour la plupart des processus tumoraux. Mais, alors, quel serait le rôle du hasard dans ces processus? Et, dans ce cas, qu'entend-on par le mot « hasard » ?

Selon le Dictionnaire Larousse « *le hasard n'a pas acquis l'objectivité scientifique* ». Il y est défini comme la « *cause d'événements apparemment fortuits ou inexplicables* » et « *seule la relation entre le calcul des probabilités et l'imprévisibilité d'un événement est la condition première d'une transformation de la notion de hasard en concept scientifique* ». Ce hasard dont parlent Tomasetti et coll. ne résulterait-il pas de processus régis par des équations, des lois, des mécanismes encore incompris et donc encore inexplicables au jour d'aujourd'hui ?

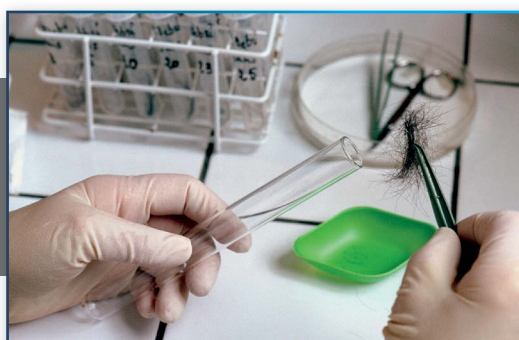
Quoi qu'en soit la substantifique moelle, ces articles présentent la vertu de rappeler que la pathogenèse des cancers est multifactorielle et qu'il est essentiel de prendre en compte cette complexité et ses multiples facettes, non seulement dans la prévention mais aussi, et surtout, dans la décision thérapeutique, une fois le cancer établi. Sur le plan de la prévention, il est clair que la connaissance des facteurs de risque et de susceptibilité aux cancers ne peut être que bénéfique en terme de santé publique. Sur le plan thérapeutique, cibler les cellules malignes reste bien sûr indispensable, mais réguler les interactions entre ces cellules et leur environnement régulateur est tout aussi essentiel si on veut espérer les éradiquer. Si, d'après le philosophe grec Démocrite, « *tout ce qui existe dans l'Univers est le fruit du hasard et de la nécessité* », en serait-il de même pour le processus tumoral? Mais, alors, quelle serait la part du hasard et quelle en serait la nécessité? ■■

Tomasetti C and Vogelstein B. *Science*. 2015 Jan 2;347(6217):78-81. doi: 10.1126/science.1260825

Wu S et Coll. *Nature*. 2015 Dec 16. doi: 10.1038/nature16166. [Epub ahead of print]

Actualités en toxicologie

Isabelle Morel^a, Claude Guiguen^b



AVANT-PROPOS

Un numéro spécial consacré à la toxicologie dans la *Revue Francophone des Laboratoires* est-ce pertinent ? Bien sûr tous les biologistes, lecteurs de ce beau journal, ne sont pas familiarisés aux techniques toxicologiques mais y apprendront beaucoup. L'idée est née suite aux premières Journées Scientifiques de l'Association de Formation Continue en Biologie Médicale de Bretagne et Pays de Loire dites « Journées Alain Feuillu », en hommage à notre très cher collègue disparu trop précocement.

La personnalité d'Alain Feuillu a marqué tous les biologistes de l'hexagone et au-delà. Il a su rassembler les biologistes, indépendamment de leurs origines ou de leurs modes d'exercice et a organisé en Bretagne et très souvent au sein même des locaux

de l'UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques de Rennes plusieurs congrès dont le niveau scientifique et la convivialité restent dans toutes les mémoires. Ces premières journées se sont déroulées les 22 et 23 mai 2014 sur le campus Santé de Rennes avec 2 sessions, l'une clinico-biologique consacrée à l'hémostase et l'autre à la pharmacotoxicologie, un de ses domaines de prédilection. De cette deuxième session sont issus plusieurs articles qui illustrent ce numéro.

Ainsi un des thèmes scientifiques d'actualité pour les toxicologues et présenté dans ce dossier par le Pr Jean-Pierre Goullé de la faculté de médecine pharmacie de Rouen, concerne l'arrivée exponentielle sur le marché de nouvelles drogues ou produits de synthèse (NPS). Facilement accessibles *via* internet et souvent plus rapidement que la législation en vigueur pour les interdire, ces substances présentent des effets psychoactifs et toxiques dont il est difficile d'appréhender les risques. Dans cet objectif, un dispositif d'alerte précoce a été mis en place afin d'adopter des décisions rapides en matière de réglementation et de pénalisation. Le challenge pour le toxicologue consiste en pouvoir détecter ces nouvelles drogues de synthèse chez l'homme, en cas d'intoxication ou de décès, le panel de ces produits étant extrêmement large et diversifié. Dans la continuité de cette présentation, sachant que le cannabis pourrait être de nos jours considéré comme une nouvelle drogue en raison de sa concentration fortement augmentée par rapport

a Laboratoire de toxicologie biologique et médico-légale
CHU Rennes
F - 35033 Rennes

b Service parasitologie et zoologie
Faculté de Médecine
2, av. du Pr Léon-Bernard – CS 34317
35043 Rennes cedex

* Correspondance
claude.guiguen@univ-rennes1.fr

à plusieurs années auparavant, le Dr Jean-Michel Gaulier du CHU de Lille présente le cannabis comme constituant de nouveaux défis pour le biologiste toxicologue. En effet, du fait que le cannabis puisse correspondre à un produit de grande consommation en France, son dépistage et les suivis de sevrage font l'objet de demandes croissantes. Les outils analytiques mis en œuvre, avec les limites qui leurs sont liées, ainsi que les pièges à éviter doivent être pris en considération dans l'interprétation des résultats. De plus, les expositions chroniques des enfants des consommateurs de cannabis font émerger de nouvelles questions de santé publique qui sont discutées dans cet exposé.

Ainsi chaque individu n'est pas égal face à l'exposition aux toxiques et xénobiotiques, non seulement de par son environnement mais aussi en raison de son patrimoine génétique. Comme l'explique le Pr Delphine Allorge du CHU-faculté de pharmacie de Lille, la toxicogénétique conditionne la réponse de l'individu aux toxiques en fonction de son équipement enzymatique. Sous-discipline de la pharmacogénétique, la toxicogénétique permet d'expliquer l'apparition d'effets indésirables voire même toxiques dans des situations non attendues relevant aussi bien d'une prise en charge thérapeutique que d'un cadre médico-légal. Les méthodes analytiques de phénotypage et de génotypage permettent ainsi d'expliquer certains cas de toxicité survenant lors de l'administration de médicaments tels que les thiopuriques, morphiniques, et morphinomimétiques ainsi que les antidépresseurs. La connaissance du « statut génétique » du patient permettra à l'avenir d'individualiser les traitements médicamenteux et ainsi d'en limiter les effets indésirables et manifestations toxiques.

Les outils analytiques disponibles pour le biologiste toxicologue relèvent aussi bien de ceux nécessaires au typage génétique que de ceux permettant le dosage spécifique du toxique. Récemment, la spectrométrie de masse haute résolution a fait son apparition dans les laboratoires spécialisés en toxicologie et ses applications ont révolutionné les performances de dépistage des intoxications et d'identification du toxique impliqué. Ainsi, le Dr Élodie Saussereau du CH du Havre nous présente les intérêts et applications de cet outil analytique employé à des fins de « screening toxicologique ». Son utilisation dans un contexte d'urgence peut être optimisée par une préparation « en ligne » de l'échantillon biologique, diminuant considérablement le délai de rendu des résultats. De plus, l'application de cette technologie à différents types de matrices biologiques (sang, urines, cheveux...) ainsi que la possibilité de détecter les métabolites du xénobio-

tique permettent d'élargir les fenêtres de détection et d'optimiser, pour le toxicologue, les possibilités de mettre en évidence le toxique impliqué.

Parmi les applications potentielles de l'utilisation de telles méthodologies, se trouve la mise en évidence de nouveaux marqueurs biologiques de la consommation d'alcool que sont l'éthylglucuronide et l'éthylsulfate. Comme le décrit le Pr Isabelle Morel du CHU-faculté de pharmacie de Rennes, les potentialités d'utilisation de ces marqueurs à des fins de mise en évidence d'une exposition à l'éthanol sont très importantes aussi bien dans un contexte clinique que dans un cadre médico-légal. Les limites des méthodes analytiques et des matrices biologiques employées ainsi que les précautions d'interprétation demeurent toutefois la préoccupation majeure du toxicologue dans l'exploitation de ces paramètres biologiques.

Ces cinq chapitres abordent les thèmes d'actualité des biologistes toxicologues ; nous en remercions les auteurs. Suivent les traditionnelles QCMs pour évaluer nos connaissances, à vous de les découvrir. Nous espérons que le lecteur trouvera dans ce dossier un ensemble d'informations relatives aux évolutions actuelles de la toxicologie reposant sur l'essor des technologies et sur les préoccupations relevant du domaine de la santé publique. Nous vous souhaitons une excellente lecture.

Sommaire thématique

- Cannabinoïdes de synthèse et nouvelles drogues.
Quoi de neuf ? p. 33
- Cannabis : les nouveaux défis du biologiste p. 43
- La pharmacotoxigénétique et ses applications médicales actuelles p. 51
- Intérêt et applications en toxicologie analytique du couplage UPLC-Spectrométrie de masse haute résolution avec extraction en ligne des échantillons p. 59
- Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool p. 69
- QCM p. 76

La coordination de ce dossier a été assurée par le Pr Claude Guiguen, Service parasitologie et zoologie, Faculté de Médecine de Rennes.

Cannabinoïdes de synthèse et nouvelles drogues. Quoi de neuf ?

Jean-Pierre Goullé^a, Michel Guerbet^a

RÉSUMÉ

Pour la première fois en 2014, plus de 100 nouvelles drogues sont apparues sur le marché européen - ce qui représente une augmentation de 25 % par rapport à 2013 - et parmi elles 56 nouvelles drogues ont été identifiées en France - soit une augmentation de 50 % par rapport à 2013. En 2014 en Europe, parmi les 101 nouvelles drogues, 31 sont des cathinones de synthèse, ce qui en fait la catégorie la plus nombreuse, immédiatement suivie par 30 cannabinoïdes synthétiques. Le dispositif d'alerte précoce de l'Union Européenne surveille actuellement plus de 450 nouvelles substances psychoactives. Depuis 2014, six d'entre elles font l'objet d'une évaluation des risques. Au cours des dernières années, ces nouvelles drogues ont été responsables d'un nombre croissant d'effets néfastes, d'hospitalisations, voire de décès. La surdose de drogue reste la principale cause de décès chez les usagers problématiques de drogues. L'estimation de l'Union Européenne pour 2013 est d'un minimum de 6 100 décès ; soit une légère augmentation par rapport à 2012. L'héroïne ou ses métabolites sont présents dans la majorité des surdoses mortelles signalées en Europe, souvent en combinaison avec d'autres substances. Mais dans certains pays, en Hongrie par exemple, ces nouvelles substances psychoactives ont été détectées dans environ la moitié des décès dus aux drogues en 2013. Au cours des dernières années, les méfaits sanitaires et sociaux liés à l'utilisation de ces nouvelles drogues constituent une préoccupation majeure au sein de l'Union européenne et en France.

Cannabinoïdes de synthèse – cathinones de synthèse – phénéthylamines – , Europe.

1. Introduction : en 2014, deux nouvelles drogues par semaine sur le marché européen, une par semaine en France.

À côté des drogues traditionnelles comme l'héroïne, la cocaïne, l'ecstasy et le cannabis toujours bien présents, on trouve de nouvelles drogues qui représentent un danger supplémentaire considérable pour la santé, en particulier

a Laboratoire de Toxicologie, ABTE ToxEMAC EA 4651
Faculté de Médecine et de Pharmacie
Laboratoire de Toxicologie
22, boulevard Gambetta
76183 Rouen CEDEX 1

* Correspondance

jean-pierre.goullé@univ-rouen.fr

article reçu le 13 août, accepté le 30 septembre 2015

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Synthetic cannabinoids and new drugs of abuse. What's new ?

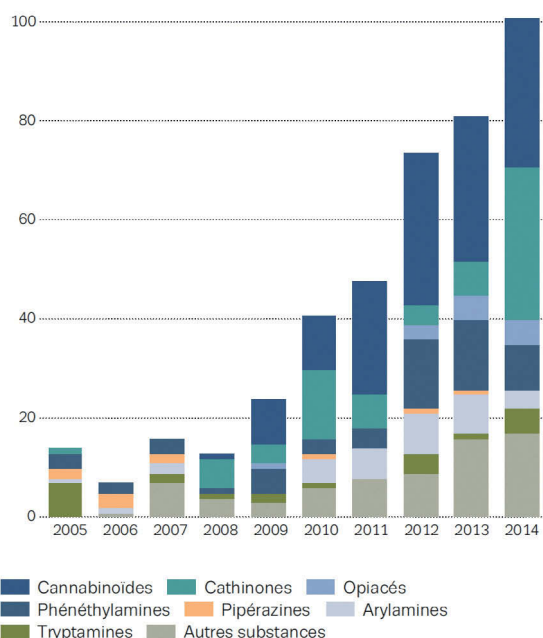
For the first time, in 2014 over 100 new drugs of abuse appeared on the European market - which represents a 25 % increase on 2013 - and 56 on the French market - which represents a 50 % increase on 2013. Thirty-one of these substances are synthetic cathinones, making this the largest category of new drugs identified in Europe in 2014, followed by 30 synthetic cannabinoids. The European Union Early Warning System is currently monitoring more than 450 new psychoactive substances. In 2014, six new psychoactive substances were risk-assessed. These new drugs emerged in Europe in the past few years and have been linked to growing numbers of reports of harm, including hospitalisations and deaths. Overall, drug overdose continues to be the main cause of death among problem drug users. The EU estimate for 2013 is a minimum of 6 100 deaths. This is a slight increase from 2012. Heroin or its metabolites are present in the majority of fatal overdoses reported in Europe, often in combination with other substances. In some countries, Hungary, for example, new psychoactive substances were detected in around half of the reported drug-induced deaths in 2013. Despite positive developments in recent years, the health and social harms associated with the use of these drugs remain a key concern across the European Union and in France.

Synthetic cannabinoids – synthetic cathinones – phenethylamines – Europe.

pour les plus jeunes. Ce nouveau danger frappe de nombreux pays. Nous assistons depuis quelques années à une prolifération du nombre de ces nouvelles drogues proposées via Internet sur le marché français et européen. Jusqu'en 2008, les nouvelles drogues qui apparaissaient chaque année sur ce marché se comptaient sur les doigts des deux mains, aujourd'hui ce sont deux nouvelles drogues qui sont disponibles chaque semaine. Il en a été dénombré 101 au cours de l'année 2014. Il est très facile de s'en procurer sur Internet et de se faire livrer à domicile par voie postale. Nous avons aujourd'hui un marché très lucratif à l'abri de tout contrôle, qui constitue l'activité principale de la criminalité organisée. Face à cette situation très préoccupante, l'Union Européenne (UE) a créé des structures de surveillance pour suivre, analyser et maîtriser cet afflux dont les conséquences pourraient être désastreuses s'il n'était pas contenu.

Figure 1 – principaux groupes de nouvelles substances psychoactives apparues en Europe entre 2005 et 2014. Source OEDT, 2015 [1]

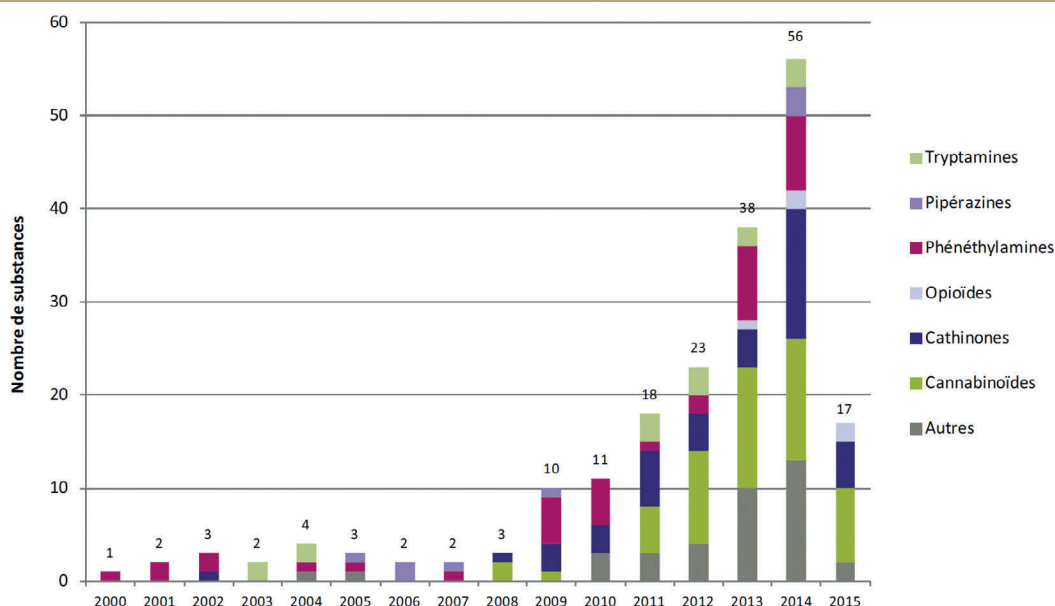
Nombre et catégories de nouvelles substances psychoactives notifiées au système d'alerte précoce (EWS) de l'UE, 2005–14



On constate en effet une demande pressante de consommateurs à la recherche de substances toujours plus actives mais aussi de sensations nouvelles, et simultanément des chimistes véreux capables de répondre aux sollicitations. À la lumière de ces constats, dans ses rapports en date des 27 mai 2014 et 5 juin 2015, l'Observatoire Européen des Drogues et Toxicomanies (OEDT) tirait la sonnette

d'alarme à propos de ces nouvelles drogues qu'il nomme *nouvelles substances psychoactives* (NSP) pour bien indiquer leur cible. L'OEDT a développé un dispositif européen d'alerte précoce ou Early Warning System (EWS) qui montre une progression fulgurante de leur nombre : 13 nouvelles drogues en 2008, 41 en 2010, 73 en 2012, 81 en 2013 et 101 en 2014, sans compter celles qui n'ont pas encore été identifiées ! (figure 1) [1]. Au total l'OEDT surveille fin 2014 plus de 450 NSP dont plus de la moitié a été détectée au cours des trois dernières années. Nombre d'entre elles sont plus puissantes et beaucoup plus toxiques que les drogues traditionnelles. Menaçant même parfois le pronostic vital, elles représentent un véritable danger pour la santé des utilisateurs. L'UE a donc décidé de mettre en œuvre une politique pour lutter contre leur diffusion dans un marché européen en pleine expansion. On observe une véritable compétition entre les nouvelles drogues offertes sur le marché. À eux seuls, les cannabinoïdes de synthèse, généralement plus puissants que le cannabis dont ils miment les effets, apparus pour la première fois en décembre 2008, sont au nombre de 134 à la fin de l'année 2014. Les cathinones ne sont pas en reste puisqu'elles représentent avec les cannabinoïdes de synthèse, les deux-tiers des NSP identifiées par l'EWS. En 2014 parmi les 101 nouvelles drogues identifiées, on trouve 31 cathinones et 30 cannabinoïdes de synthèse [1]. La France n'échappe pas à ce nouveau phénomène avec 56 NSP identifiées en 2014, soit une par semaine, en augmentation de +50 % par rapport à 2013, année au cours de laquelle 38 NSP ont été identifiées ; alors qu'elles n'étaient que de 1 à 4 au cours de la période 2000-2008. Comme en Europe, c'est à partir de 2009 que leur nombre connaît une forte augmentation (figure 2) [2]. Ce phénomène, loin d'être localisé à la France et à l'Europe, touche également les États-Unis et de nombreux autres pays dans le monde.

Figure 2 – principaux groupes de nouvelles substances psychoactives apparues en France entre 2000 et début 2015. Source SINTES, 2015 [2]



2. Internet et le cybermarché noir: un marché en plein essor avec de nouvelles drogues de plus en plus diversifiées

L'analyse du marché est compliquée par l'émergence de NSP chimiques ou naturelles non réglementées donc inconnues par le droit international et fréquemment conçues dans le but d'imiter les effets des drogues interdites. Le produit fini, ou le plus souvent un intermédiaire de synthèse, est fabriqué à très bas coût en Chine ou en Inde, où il a une existence légale, puis il est vendu en Europe. La plupart des cannabinoïdes synthétiques sont fabriqués en Chine, puis acheminés en vrac, par l'intermédiaire de réseaux de transport et de distribution ayant pignon sur rue. Une fois dans l'UE, ces cannabinoïdes sont généralement mélangés à des végétaux séchés ou pulvérisés, puis conditionnés comme « euphorisants légaux » ou « *legal highs* » pour être vendus sur Internet ou par des intermédiaires. En 2013, 35 000 saisies ont été notifiées à l'EWS, en majorité des cathinones (31 %) et des cannabinoïdes de synthèse (30 %) [1] ; malheureusement aucune donnée n'est disponible pour la France. Enfin, ces nouvelles drogues sont parfois produites en Europe à partir d'intermédiaires de synthèse, dans des laboratoires clandestins, principalement localisés dans le Nord et l'Est de l'Europe, puis vendues directement. Comme dans de nombreux domaines, mais tout particulièrement celui des drogues, la vente sur Internet occupe une place de plus en plus importante et pose de sérieux problèmes pour contrôler et freiner cette offre. La possibilité pour les fabricants, les grossistes, les revendeurs, les hébergeurs de sites web et de paiement d'être localisés dans différents pays et de plus très mobiles, rend la situation particulièrement difficile à maîtriser. En 2013, l'UE a recensé 651 sites Internet [1] proposant ces nouvelles drogues sous le label « *legal highs* » ou sous des appellations des plus fantaisistes, afin d'en falsifier l'identité comme « produit chimique destiné à la recherche », « engrais » voire « complément alimentaire ». Un nombre croissant de ces nouvelles drogues est aussi proposé à la vente en tant que simple médicament ou comme « *smart drug* ». L'étiquetage mentionne d'ailleurs le plus souvent que l'achat n'est pas destiné à la consommation humaine. C'est aussi habituellement avec la mention « *not for human consumption* » figurant sur l'emballage que les cannabinoïdes de synthèse sont proposés. Ce trafic de drogue en ligne est assuré par des sites dont le degré de sophistication rivalise avec les meilleurs sites légaux, disposant même parfois d'un véritable support technique. À cela s'ajoute un nouveau défi : le cybermarché noir ou le recours récent à des réseaux clandestins anonymes du cybermarché noir ou *darknets* pour écouler toutes ces drogues auprès de dealers et de consommateurs. Ce nouveau marché échappe à tout contrôle car les transactions sont anonymes. Le premier exemple fut le site *Silk Road* (ce qui veut dire route de la soie) qui a été créé en 2011 et qui rend anonymes tous les échanges grâce à une technologie informatique très sophistiquée appelée « *TOR* » ou *The Onion Router* (routeur en couche d'oignon) [3].

Chaque intermédiaire a accès à une couche, mais aucun ne peut « peler l'oignon », pour accéder au cœur de celui-ci, qui contient le message. Ces nombreuses couches masquent les adresses IP des ordinateurs, garantissant ainsi l'anonymat des transactions. Grâce à cette technologie, des cyberdealers mettent en relation les clients avec les sites marchands moyennant une commission. Les achats sont payés à l'aide d'une monnaie officielle fictive, le bitcoin, qui permet à l'acheteur de conserver l'anonymat, son argent étant déposé sur un compte dédié. Le site *Silk Road 1* a été démantelé et fermé par le FBI en octobre 2013 puis fermé après 18 mois d'enquête [3]. Le chef de ce réseau, Ross Ulbricht, âgé de 31 ans a été condamné aux USA à la prison à vie le 29 mai 2015. Le site *Silk Road 2* qui avait pris le relais est également tombé un an plus tard. Selon la cyberdouane, il y aurait en France une centaine de ces cyberdealers d'un nouveau genre [3].

3. Le dispositif d'alerte précoce ou *early warning system* (EWS) et le réseau européen d'information sur les drogues et les toxicomanies (REITOX) [4]

L'OEDT a mis en place un **Réseau Européen d'Information sur les drogues et les TOXicomanies (REITOX)**. Il est constitué de points nationaux qui permettent de recueillir les informations dans l'ensemble des pays de l'Union. Le dispositif EWS permet d'assurer la détection de nouvelles drogues synthétiques et d'évaluer leurs risques potentiels pour que le Conseil de l'Union puisse adopter des décisions en matière de réglementation et de pénalisation dans l'ensemble des États. L'OEDT s'appuie également sur d'autres Agences européennes pour recueillir et croiser un maximum d'informations : l'Agence européenne du médicament (**EMA**) et **Europol** qui est une Agence de police criminelle intergouvernementale qui facilite l'échange de renseignements entre les polices nationales des États membres, en particulier en matière de stupéfiants. L'EWS est un dispositif d'informations qui fonctionne en temps réel, au travers d'un système déclaratif dont le coût de fonctionnement est réduit, les renseignements étant recueillis et partagés au niveau européen. À partir de toutes les déclarations, une fiche est établie pour chaque substance : date de création de la fiche, ou de sa mise à jour, type de substance, nom, nature, formule chimique, réglementation dans les pays de l'Union, alertes et rapports pour chacune d'entre elles. La base européenne de données sur ces NSP s'appuie également sur de nombreuses autres sources d'information : les données de toxicologie clinique et de toxicologie médico-légale, les résultats d'analyse d'eaux usées, Internet, les médias, les utilisateurs ; mais également l'achat de substances proposées à la vente. Grâce à l'EWS, le nombre de déclarations a augmenté de manière considérable pour passer de 90 en 2009 à 169 en 2010, puis 208 en 2011, 421 en 2012 et 444 en 2013. Chaque année, des brochures détaillées sont éditées, qu'il s'agisse de substances réglementées ou non. Ainsi un guide sur la méphédronne a été publié en 2010, un autre

sur le 5-IT en 2013. Parmi ces NSP, un certain nombre font l'objet d'une surveillance particulière en raison de leur responsabilité dans des intoxications graves voire mortelles, afin d'évaluer les risques liés à leur consommation. Depuis 2014, six d'entre elles sont particulièrement surveillées : le AH-7921 (opioïde de synthèse, 15 décès), la 25I-NBOMe (phénéthylamine, 1 décès, de nombreuses intoxications), méthoxétamine (arylcyclohexylamine, 20 décès), la MDPV (cathinone, 99 décès), le 4,4'-DMAR (psychostimulant, 31 décès en 1 an) et le MT45 (opioïde de synthèse, 28 décès en 9 mois) [4, 5].

4. Comment lutter contre la prolifération de ces NSP ?

Ainsi que nous l'avons évoqué, la production et l'offre de drogue constituent aujourd'hui l'activité principale de la criminalité organisée. Ce commerce est très lucratif et discret (il est beaucoup plus facile de dissimuler un laboratoire clandestin qu'un champ de pavot ou de cannabis), il nécessite moins de personnel et la distribution des produits est difficile à repérer. Le volumineux marché actuel du cannabis, à la fois importé et cultivé sur place, joint à toutes les autres NSP, a entraîné une prise de conscience des autorités de santé. Le danger sanitaire encouru est d'autant plus grand qu'il s'agit d'une activité extrêmement lucrative, en pleine expansion, permettant aux groupes criminels organisés de générer des liquidités au travers de profits tout à fait considérables, qu'il s'agisse d'ailleurs des drogues traditionnelles ou encore avec plus de facilité des NSP, qui souvent échappent à la réglementation en vigueur. L'émergence de ces dernières a également des conséquences sur la lutte antidrogue qui devient beaucoup plus difficile, puisqu'à partir d'une très faible quantité de principe actif, il est possible de produire un très grand nombre de doses. Ainsi alors qu'il faut respectivement 200 grammes de cocaïne et 750 grammes d'ecstasy pour fabriquer 10 000 doses, 2,5 grammes de méthylfentanyl et 0,1 gramme de carfentanyl suffisent ! (tableau I) [5]. Cette réduction drastique des quantités de matière première facilite leur dissimulation et donc leur trafic, en particulier par voie postale. Conséquence immédiate, tandis que les décès dus à l'héroïne sont en recul d'une manière générale, dans certains pays les décès dus à ces fentanyls progressent très vite et dépassent désormais ceux attribués à l'héroïne ! La

lutte contre la prolifération de ces NSP impose de remonter les filières jusqu'aux lieux de production. Ainsi en 2011, les autorités ont déclaré avoir démantelé 350 sites de production de dérivés amphétaminiques en Europe, pour la plupart localisées en République tchèque. Alors que la part de l'héroïne a diminué partout en Europe au cours de ces dernières années, les stimulants, les drogues de synthèse (cannabinoïdes, cathinones, phénéthylamines, opioïdes), le cannabis et les médicaments détournés de leur usage gagnent sans cesse du terrain [1, 5].

5. Pourquoi toutes ces nouvelles drogues ?

Parmi les raisons à cette explosion des nouvelles drogues, la recherche de sensations toujours plus fortes est déterminante ; la quête de drogues pouvant exercer des effets stimulants sur le système nerveux central, des effets euphorisants, ou hallucinogènes, voire de substances possédant à la fois toutes ces propriétés. Il y a donc un marché. Une autre raison, qui explique l'effet amplificateur de la demande, est la possibilité d'acquiescer en toute légalité, sans risque pour l'acheteur, des produits « inconnus » que la réglementation n'a pas encore classés dans la catégorie des drogues, ce qui permet d'échapper à toute poursuite en cas de saisie. De plus, la consommation de la plupart de ces NSP échappe aux dépistages biologiques habituels réalisés dans la salive ou les urines. Alors que la consommation des drogues traditionnelles comme le cannabis, l'héroïne, la cocaïne ou l'ecstasy est facilement mise en évidence par le dépistage salivaire ou urinaire, ces tests biologiques sont totalement inopérants pour les NSP. Ainsi le consommateur de cannabis échappera à tout contrôle en substituant la résine de cannabis dans son tabac par des cannabinoïdes de synthèse qu'il peut se procurer le plus facilement du monde sur la toile. Leur détection impose des tests spécifiques qui ne sont pas encore pratiqués en routine en France et dans la plupart des pays, qu'il s'agisse du dépistage d'un conducteur dans le cadre de la sécurité routière, ou de la surveillance médicale d'un sujet exerçant une activité professionnelle à risque. Il y a plus d'un quart de siècle, un visionnaire, Gary Henderson avait tout prédit sur les drogues du futur [6] en affirmant qu'« elles seront plutôt d'origine synthétique que de nature végétale. Leur synthèse se fera à partir de produits chimiques disponibles, peut-être des dérivés de médicaments, elles seront puissantes et leur action sera sélective. De plus, elles seront commercialisées avec ingéniosité ».

6. Quels sont leurs effets pathologiques et quelle est leur toxicité ?

Les nouvelles drogues sont principalement des stimulants centraux et des hallucinogènes. Elles présentent de plus un très fort pouvoir addictogène. Leur consommation, même limitée, peut être préoccupante en raison de la grave toxicité de certaines NSP [1, 7]. Le réseau européen d'analyse des situations d'urgence imputables aux drogues,

Tableau I – Quantité de drogue nécessaire à la production de 10 000 doses.

Drogues traditionnelles	
Ecstasy (MDMA)	750 grammes
Cocaïne	200 grammes
Amphétamine	100 grammes
Nouvelles drogues	
Phényléthylamine	5 grammes
2-Méthylfentanyl	2,5 grammes
Carfentanyl	0,1 gramme

Source OEDT, 2014 [5]

qui surveille les admissions aux services d'urgence dans dix pays, a révélé que 9 % d'entre elles impliquaient des NSP, essentiellement des cathinones [1]. En 2014, l'EWS a lancé 16 alertes concernant ces nouvelles substances surveillées par le dispositif; bon nombre d'entre elles rapportant des effets indésirables graves et en particulier des décès [8], dont 135 consécutifs à la prise de trois molécules [1]. Cependant l'héroïne ou ses métabolites sont encore impliqués dans la majorité des décès par surdose en Europe au nombre de 6 100 en 2013 [1, 5] en légère hausse par rapport à 2012, et qui demeurent une cause importante de mortalité évitable, surtout chez les jeunes. En France le nombre annuel de décès par surdose est de 340, dont la moitié pour lesquels on trouve un opiacé seul ou associé à d'autres molécules [1, 5]. À l'inverse, en Hongrie des NSP ont été détectées dans environ 50 % des décès liés aux drogues en 2013 [1]. Les nouveautés proposées à la vente sont actives à des **doses de plus en plus faibles, augmentant ainsi le risque de surdosage** [5]. Il s'y ajoute un réel problème analytique car ces drogues ne sont pas détectables par les méthodes classiques. En effet, elles sont présentes en très faibles concentrations dans l'organisme et leur mise en évidence dans les milieux biologiques nécessite la mise en œuvre de techniques analytiques spécifiques. Les statistiques sont donc vraisemblablement très largement sous-estimées quant à la mortalité qui leur est attribuée. Nous nous limiterons à la description des effets des drogues que l'on rencontre le plus fréquemment sur le marché: les cannabinoïdes de synthèse et les cathinones.

6.1. Les cannabinoïdes de synthèse

Les cannabinoïdes de synthèse qui dominent avec les cathinones le marché des NSP, ont une toxicité beaucoup plus marquée que celle du cannabis, avec un plus grand nombre d'effets secondaires toxiques que ce dernier. Agissant sur les récepteurs ubiquistes CB1, leurs effets sont assez similaires à ceux du cannabis. Toutefois on note trois fois plus d'hypertension artérielle et de vertiges, mais surtout six fois plus d'hallucinations et trois fois plus de tachycardie qui menacent le pronostic vital (*tableau II*) [9]. On constate avec les cannabinoïdes de synthèse des intoxications beaucoup plus sévères qu'avec le cannabis [10-15]. Des intoxications à conséquence mortelle par défenestrations et automutilations consécutives au syndrome hallucinatoire, par arrêt cardiaque et infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ont été rapportées [10, 16-19]. Les centres antipoison américains font état de la prise en charge de 7 000 dossiers de patients victimes de cannabinoïdes de synthèse pour la seule année 2011.

6.2. Les cathinones de synthèse

Elles sont courantes sur le marché des stimulants illicites dans certains pays européens et sont souvent consommées de manière interchangeable avec les amphétamines ou l'ecstasy. L'injection de cathinones de synthèse, sans être répandue en Europe, constitue un sujet préoccupant localisé dans des groupes d'usagers problématiques de drogues dans certains pays [1]. Ainsi, l'injection de méthamphétamine avec d'autres stimulants, le plus souvent des cathinones de synthèse dans un contexte de

Tableau II – Cannabis et cannabinoïdes de synthèse: fréquences comparées des effets secondaires selon Forrester [9]

	THC (n = 418)	Spices (n = 99)
Tachycardie	13 %	37 %
Agitation	08 %	19 %
Somnolence	14 %	18 %
Vomissements	08 %	15 %
Hallucinations	02 %	11 %
HTA	03 %	10 %
Nausées	03 %	09 %
Confusion	07 %	09 %
Vertiges	03 %	09 %
Douleurs thoraciques	09 %	07 %

marathon homosexuel, est également signalée dans des pays européens. Ces pratiques dites de « *slam* » suscitent des inquiétudes en raison de la prise de risque tant dans la consommation de drogues que dans le comportement sexuel [1, 7]. Les effets psychostimulants exercés sont assez similaires à ceux des amphétamines ou de la cocaïne. Les cathinones augmentent la concentration synaptique des monoamines [7]. L'intoxication aiguë aux cathinones de synthèse est susceptible de menacer le pronostic vital car elle peut associer des troubles cardiaques incluant tachycardie, douleurs thoraciques, hypertension artérielle, anomalies électriques à l'ECG, hyperthermie, œdème cérébral, convulsions, rhabdomyolyse et complications psychiatriques aiguës [7]. Les cathinones de synthèse figurent parmi les substances le plus fréquemment à l'origine de décès [1, 5, 20-23].

7. Fréquence d'usage des NSP en France chez les 15-24 ans

La prévalence de la consommation de ces substances semble être faible en France [1]. Toutefois, une enquête récente menée en Europe de l'ouest chez 13 000 sujets âgés de 15 à 24 ans a révélé que la fréquence d'usage d'au moins une NSP dans l'année était la plus forte en Irlande (9 %), suivie par la France (8 %) et l'Espagne (8 %) [24].

8. Le cannabis 2015 est-il une nouvelle drogue ?

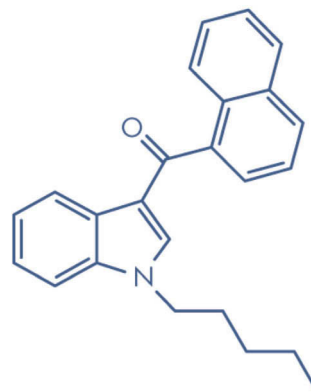
Avant d'évoquer les NSP, on peut se poser la question suivante: le cannabis que l'on trouve sur le marché en 2015 est-il une nouvelle drogue? Qu'il s'agisse de la drogue sous forme d'herbe ou de résine, on peut répondre par l'affirmative à cette question car une augmentation de la concentration en principe actif, le tétrahydrocannabinol (THC) est constatée au cours des dernières années. Dans son dernier rapport de juin 2015, l'OEDT mentionne que les teneurs moyennes en THC de l'herbe ont doublé en

Figure 3 – Exemple de sachet de « spice »



Source point focal du Royaume-Uni, OEDT.

Figure 4 – Structure moléculaire du JWH-018



Source OEDT.

cinq ans et celles de la résine ont doublé en 10 ans [1]. Ce phénomène est confirmé en France où les résultats des analyses de saisies de résine de cannabis révèlent que la concentration moyenne en principe actif a été multipliée par quatre en 20 ans, pour passer en moyenne de 4,4 % en 1993 à 16 % en 2012 [25]. L'augmentation de la concentration de la drogue en THC est semblable-t-il contemporaine de l'apparition de pathologies nouvelles, principalement des atteintes ischémiques touchant divers territoires : coronariennes à type d'infarctus de myocarde [26-29], cérébrales avec des accidents vasculaires [30-32], les membres inférieurs avec des artérites [26].

9. Les cannabinoïdes de synthèse

Comme nous l'avons évoqué, les premiers cannabinoïdes de synthèse ont été identifiés sur le marché des drogues fin 2008. Ce sont pourtant des molécules connues de longue date puisque le premier d'entre eux, le HU210 a été synthétisé en 1988. Les NSP ont initialement été développés le plus souvent par l'industrie pharmaceutique, à des fins de recherche médicale, pour mettre au point des médicaments actifs sur les récepteurs des cannabinoïdes, dotés d'activités analgésique et anti-inflammatoire, sans effets psychoactifs ; mais dont aucun n'a pu être commercialisé en raison de rapports bénéfices/risques défavorables. Synthétisés aujourd'hui par des laboratoires clandestins, ils sont massivement détournés d'un usage médical à des fins récréatives et se retrouvent sur le marché de la drogue. Ils sont ensuite interdits, mais aussitôt de nouveaux dérivés sont synthétisés en greffant sur les noyaux des radicaux différents pour modifier leur formule et échapper ainsi à la réglementation. À ce jour l'EWS en a identifié plus de 140 [1,2]. Avec les cathinones, les cannabinoïdes de synthèse constituent le groupe le plus important des NSP. D'apparition récente, le premier d'entre eux, le JWH-018 a été proposé comme « spice » dans un mélange à fumer (figure 3). On dénombre 14 familles chimiques [33] regroupées en 7 groupes structuraux principaux : le dérivé historique (HU-210), les naphthylindoles (JWH-018 : figure 4, JWH-073, AM-2201), les naphthylméthylindoles (JWH-175 et 184), les naphthylpyrroles

(JWH-30), les naphthylméthylindènes (JWH-176), les cyclohexylphénols (CP-47,497 ; CP-55,490), phénylcétylindoles ou benzoylindoles (JWH-250, RCS-4 et 8). Les différents cannabinoïdes de synthèse identifiés en France sont regroupés **tableau III**. Après leur synthèse chimique, la poudre obtenue est mise en solution puis pulvérisée sur un mélange végétal dont la composition est très variable, mais rarement précisée. Les végétaux choisis exercent eux-mêmes parfois des effets pharmacologiques, par exemple de type « cannabis like » comme pour *Leonotis Leonorus* [25]. Ils sont conditionnés en sachets contenant en général 3 grammes de matière végétale sèche à laquelle un ou plusieurs cannabinoïdes ont été ajoutés. Finalement, ils sont introduits dans une pipe ou mélangés dans le tabac d'une cigarette. Ils sont vendus sur Internet, sous des noms très fantaisistes (*Dream, K3 Legal, Magic, Red Magic, Spice Gold Spirit, Star Fire,...*), comme « encens destiné à être brûlé » ou « pot-pourri », affichés « impropre à la consommation humaine », pour « usage aromatique seulement ». En plus de la recherche d'effets « cannabis like » renforcés, leur immense succès s'explique par le fait que les techniques analytiques utilisées pour dépister l'usage de cannabis sont inopérantes, ce qui permet leur consommation dans les situations où la prise de drogue est sanctionnée, mais aussi par des catégories professionnelles qui font l'objet de dépistages réguliers. En France, ils ont fait récemment l'objet d'une enquête de niveau d'usage dans le cadre du baromètre santé [34]. L'usage au cours de la vie est de 1,7 % pour les 18-64 ans et de 4,0 % pour les 18-34 ans, ce qui les situe à un niveau d'usage similaire à celui de l'héroïne ou des amphétamines [34].

10. Les cathinones de synthèse

Contrairement aux cannabinoïdes de synthèse qui sont comme le cannabis exclusivement consommés par voie inhalée, les cathinones de synthèse sont utilisées soit par voie orale, soit par voie intranasale ou intraveineuse, cette dernière étant souvent privilégiée chez les homosexuels dans les pratiques dites de « slam ». Ce sont des analogues de la cathinone, principe actif contenu dans le

Tableau III – Liste des NPS identifiés sur le territoire français et signalés à l'OFDT entre 2000 et mai 2015
(*classés comme stupéfiants en France).

Cannabinoïdes	Cathinones	Phénéthylamines	Tryptamines	Pipérazines	Opioides	Autres
2008	2002	2000	2003	2005	2013	2004
CP47,497 (C8+C10)*	Bupropion	4-MTA*	AMT	mCPP	AH-7921	Asarone
JWH-018*	2008	2001	DMT	2006	2014	2005
2009	Mephedrone*	2C-B*	2004	pCPP	Acetylfentanyl	Tiletamine*
JWH-073*	2009	2C-T-7*	5-MeO-DIPT	TMFPP*	Despropionyl-o-fluorofentanyl	2010
2011	3-FMC*	2002	5-MeO-DMT	2007	2015	MDAI
AM-2201*	4-FMC*	TMA-2*	2011	DBZP	Ocfentanil	pFBT
JWH-019*	Methylone*	2C-T-2*	4-AcO-DMT	2009	o-desmethylnaloxadol	x-APB
JWH-122*	2010	2004	4-AcO-MIPT	pFPP	2011	x-MeO-PCP
JWH-210*	4-MEC*	2C-I*	DIPT	2014		Methiopropamine
JWH-250*	Etcatinone*	2005	2012	3,4 CTMP		Methoxetamine*
2012	MDPV*	MDHOET	5-MeO-DALT	Methoxypiperamide		2012
HU-331	2011	2007	5-MeO-DMT	MBZP		2-AI
JWH-081*	BMDB*	N methyl PEA	5-MeO-MIPT			5-APDB
JWH-122 [5-fluoropentyl]*	Butylone*	2009	2013			Etaqualone
JWH-122 N[4-penteny]*	Ethylone*	DOB	4-HO-MIPT			Ethylphenidate*
JWH-200*	α-PVP*	DOC	5-MeO-Tryptamine	2014		2013
RCS-4	Pentylone*	4-FMP* ou 4-FA*	2014			2-DPMP
UR-144	Pentedrone*	PMMA*	4-ACO-DIPT			5-MAPB
UR-144 (-2H)	2012	1-Phenethylamine (1-PEA)	4-HO-DET			Flubromazepam
5F-UR-144 (XLR-11)*	bk-MDDMA*	2010	4-HO-MET			Phenibut
Methanandamide	MOPPP*	2C-D				x-APDB
2013	Isoethcathinone*	2C-E				x-MAPB
5F-AB-PINACA	N-ethylbuphedrone*	4-FMA				x-EAPB
5F-PB22	2013	4-MA*				N-ethylnorketamine
AB-FUBINACA	MDPPP*	Ethylamphetamine*				2-Meo Ketamine
AB-PINACA	MPPH*	2011				Methoxyphenidine
AKB-48	α-PBP*	3,4 DMMA				2014
AKB-48F	α-PVT*	2012				4,4'-DMAR
APICA	2014	25I-NBOMe				5-IAI
JWH-203	4F-Pentedrone	2C-P				LSZ
JWH-307	3-MMC*	2013				Mephtetramine
PB-22	4-EMC	25B-NBOMe				Diclazepam
Quchic	MBDB*	25C-NBOMe				Etizolam
RH-34	2-FMC*	25H-NBOMe				N-methyl-2AI
STS-135	3-CMC*	2C-C				Methylphenidate (HDMP-28)
2014	3-MeOMC*	bk-2C-B				Pramiracetam
JWH-018 indazole analogue	4-EEC*	Escaline				2-Meo-Diphenidine
AM-2201 indazole	4-MeO-α-PEP*	Proscaline				3-MeO-PCP
AM-2232	4-methyl-N,N-diethylcathinone	DMA-NBTOMe				D2PM
JWH-018 adamantyl carboxamide /	4-methyl-N-ethylnorpedrone	2014				Diphenidine
JWH-018 quinolinecarboxylate	Brephedrone (4-BMC)*	bk-MPA				2015
analogue (PB-22)	F-α-PVP	Allylescaline				2-MAPB
AM-1220	α-PEP (PV8)*	25D-NBOMe				3F-Phenmetrazine
5-CI-UR-144	2015	2C-B-FLY				
5F-AMB	2-MMC*	2-FMA				
AB-CHMINACA	Dipentylone*	2-Phenethylamine				
FUB-PB-22	MPPPP*	3C-E				
SDB-006	MDPBP*	N-methyl-bk-MMDA				
THJ-2201	nor-Mephedrone (4-MC)*	4-chloroamphetamine				
2015						
CUMYL-THPINACA						
AM-6527						
1-(5-fluoropentyl)-3-(pyrrolidine-1-carbonyl)-1-H-indole						
2-[[1-(5-fluoropentyl)-5-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]formamido]-3-methylbutanamide						
FUB-JWH 018						
MDMB-CHMICA						
NM-2201						
THJ-018						

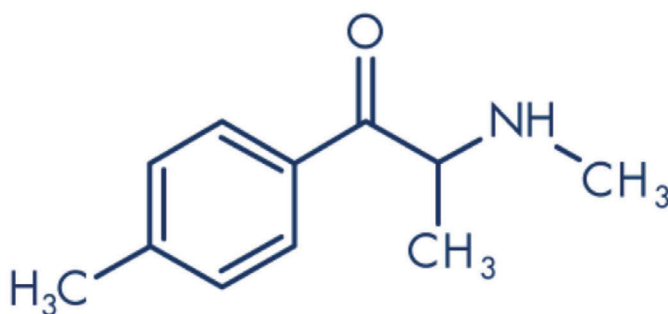
Source SINTES, 2015 [2].

Figure 5 – Exemple de sachet de 0,5 g de cathinone de synthèse.



Source OEDT.

Figure 6 – Structure moléculaire de la méthcathinone ou méphédronne



Source OEDT.

khat végétal. On trouve généralement ces produits très purs, sous forme de poudre blanche ou brune (figure 5). Les dérivés obtenus par synthèse sont souvent appelés « dérivés haute couture ». La première cathinone de synthèse apparue sur le marché est la méthcathinone ou méthylcathinone qui est la bêta-céto-amphétamine (figure 6). À partir de cette méthcathinone ou éphédronne, une cinquantaine de dérivés ont été synthétisés. Ils sont obtenus par des modifications portant soit sur le noyau aromatique (méphédronne, méthédronne, méthylone), soit sur le groupement alkyle, soit sur le groupement amine (amfépramone), soit sur les trois (méthylènedioxypropylvalérone ou MDPV). L'année 2014 a été marquée par l'apparition sur le marché de 31 cathinones de synthèse, leur nombre ayant dépassé pour la première fois celui des cannabinoïdes de synthèse (30). Fin 2014, ce sont 77 cathinones de synthèse qui ont été identifiées par l'EWS [24]. La figure 7 donne les formules de quelques cathinones de synthèse.

11. Les phénéthylamines de synthèse

Troisième catégorie par ordre de fréquence parmi les NPS, après les cannabinoïdes de synthèse et les cathinones synthétiques, elles présentent des propriétés stimulantes comme les amphétamines. Des modifications de leur structure sont à l'origine des propriétés hallucinogènes. Il existe plus de 60 dérivés identifiés, principalement hallucinogènes :

- 27 composés 2C, synthétisés par Alexander Shulgin,
- 33 composés NBOMe, dérivés très hallucinogènes, actifs à la dose de 50 microgrammes, hautement toxiques en cas de légère inhalation ou en cas de contact avec la muqueuse oculaire ou buccale. Ces composés sont imprégnés sur des carrés de papier buvard à l'image de ce qui se fait pour le LSD.
- des composés DOX également hallucinogènes.

12. Conclusion

L'apparition sur le marché chaque année d'un nombre croissant de nouvelles drogues de plus en plus actives avec pour corollaire sa cohorte d'intoxications pouvant menacer le pronostic vital, est extrêmement préoccupante. Leur mode de distribution avec le développement du marché Internet et plus récemment avec des transactions qui peuvent être totalement anonymes, pose un réel problème de Santé Publique.

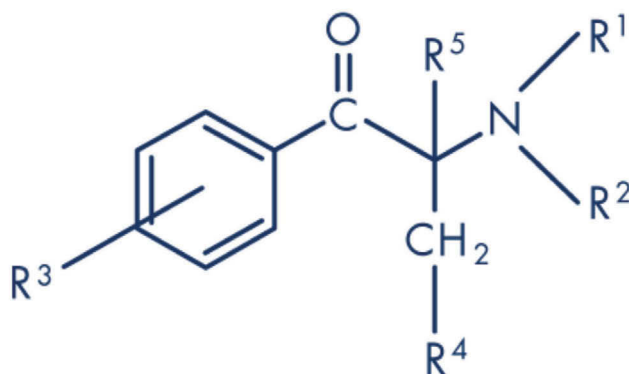
Dans un communiqué de presse en date du 17 septembre 2013, la Commission européenne a décidé d'engager une

action décisive contre ces nouvelles drogues :

« La Commission européenne a présenté aujourd'hui une proposition visant à renforcer la capacité d'action de l'UE contre les "euphorisants légaux" ces nouvelles substances psychoactives utilisées comme substituts aux drogues illicites telles que la cocaïne ou l'ecstasy. En vertu des règles proposées aujourd'hui, les substances psychoactives nocives seront rapidement retirées du marché, sans que leurs différentes utilisations industrielles et commerciales légitimes en pâtissent. Cette proposition fait suite aux avertissements lancés par l'Observatoire européen des drogues et des toxicomanies et par Europol sur l'ampleur du problème, ainsi qu'à un rapport de 2011 qui concluait à la nécessité de renforcer le dispositif européen de lutte contre ces nouvelles substances »

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article

Figure 7 – Structure générale des cathinones de synthèse et quelques cathinones.



R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Nom
H	H	H	H	H	Cathinone
Méthyle	H	H	H	H	Méthcathinone (éphédronne)
Méthyle	Méthyle	H	H	H	N,N-Diméthylcathinone (métamfépramone)
Éthyle	H	H	H	H	N-Éthylcathinone (EC)
Méthyle	H	H	Méthyle	H	Buphédronne
Éthyle	H	4-Méthyle	H	H	4-Méthyl-N-éthylcathinone
Méthyle	H	4-Méthyle	H	H	Méphédronne (4-MMC ; M-CAT)
Éthyle	Éthyle	H	H	H	Amfépramone
t-Butyle	H	3-Cl	H	H	Bupropion
Méthyle	H	3,4-Méthylenedioxy	H	H	Méthylone (βk-MDMA)
Éthyle	H	3,4-Méthylenedioxy	H	H	Éthylone (βk-MDEA)
Méthyle	H	4-Méthyle	Méthyle	H	Butylone (βk-MBDB)
Méthyle	H	4-Méthoxy	H	H	Méthédronne (βk-PMMA)
Méthyle	H	4-F	H	H	Fléphédronne (4-FMC)
Méthyle	H	3-F	H	H	3-Fluorométhcathinone (3-FMC)
{pyrrolidino}		H	H	H	α-Pyrrolidinopropiophénone (PPP)
{pyrrolidino}		4-Méthyle	H	H	4-Méthyl-α-pyrrolidinopropiophénone (MPPP)
{pyrrolidino}		4-MeO	H	H	4-méthoxy-α-pyrrolidinopropiophénone (MOPPP)
{pyrrolidino}		4-Méthyle	Propyle	H	4-Méthyl-α-pyrrolidino-hexanophénone (MPHP)
{pyrrolidino}		4-Méthyle	Éthyle	H	Pyrovalérone
{pyrrolidino}		4-Méthyle	Méthyle	H	4-Méthyl-α-pyrrolidino-butyrophénone (MPBP)
{pyrrolidino}		4-Méthyle	H	Méthyle	4-Méthyl-α-pyrrolidino-α-méthylpropyphénone
{pyrrolidino}		3,4-Méthylenedioxy	H	H	3,4-Méthylenedioxy-α-pyrrolidinopropiophénone (MDPPP)
{pyrrolidino}		3,4-Méthylenedioxy	Éthyle	H	3,4-Méthylenedioxypyrovalérone (MDPV)

Source OEDT.

Références

- [1] Rapport européen sur les drogues. tendances et évolutions. Observatoire européen des drogues et toxicomanies. 5 juin 2015, 86pp.
- [2] Nouveaux produits de synthèse identifiés en France depuis 2000. Note d'information SINTES, Observatoire français des drogues et toxicomanies. 01 juin 2015, 3pp.
- [3] Et si Internet mettait les dealers de rue au chômage? Humanoïde 2014; 3:16-29.
- [4] Observatoire européen des drogues et toxicomanies. Site Internet consulté le 8 juin 2015 <http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index373FR.html>
- [5] Rapport européen sur les drogues. tendances et évolutions. Observatoire européen des drogues et toxicomanies. 27 mai 2014, 88pp.
- [6] Henderson GL. Designer drugs past history and future prospects. J Forensic Sci. 1988;33(2):569-75.
- [7] Karila L, Mégarbane B, Chevillard L, et al. Nouveaux produits de synthèse : revue des données actuelles. Presse Med. 2015;44:383-391.
- [8] A year in review. Highlights from the EMCDDA's general report of activities 2014. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 2015, 4pp.
- [9] Forrester MB, Kleinschmidt K, Schwarz E, Young A. Synthetic cannabinoid and marijuana exposures reported to poison centers. Hum Exp Toxicol. 2012 31(10):1006-11.
- [10] Kronstrand R, Roman M, Andersson M, Eklund A. Toxicological findings of synthetic cannabinoids in recreational users. J Anal Toxicol 2013;37:534-41.
- [11] Takematsu M, Hoffman RS, Nelson LS, et al. A case of acute cerebral ischemia following inhalation of a synthetic cannabinoid. Clin Toxicol. 2014;52(9):973-5.
- [12] Buser GL, Gerona RR, Horowitz BZ, et al. Acute kidney injury associated with smoking synthetic cannabinoid. Clin Toxicol. 2014;52(7):664-73.
- [13] Smith DL, Roberts C. Synthetic marijuana use and development of catatonia in a 17-year-old male. Minn Med. 2014;97(5):38.
- [14] Ukaigwe A, Karmacharya P, Donato A. A Gut Gone to Pot: A Case of Cannabinoid Hyperemesis Syndrome due to K2, a Synthetic Cannabinoid. Case Rep Emerg Med. 2014;2014:167098.
- [15] Monte AA, Bronstein AC, Cao DJ, et al. An outbreak of exposure to a novel synthetic cannabinoid. N Engl J Med. 2014;370(4):389-90.
- [16] Patton AL, Chimalakonda KC, Moran CL, et al. K2 toxicity: fatal case of psychiatric complications following AM2201 exposure. J Forensic Sci. 2013;58(6):1676-80.
- [17] Tse R, Kodur S, Squires B, Collins N. Sudden cardiac death complicating acute myocardial infarction following synthetic cannabinoid use. Intern Med J. 2014;44(9):934-6.
- [18] Ibrahim S, Al-Saffar F, Wannenburg T. A Unique Case of Cardiac Arrest following K2 Abuse. Case Rep Cardiol. 2014;2014:120607.
- [19] Behonick G, Shanks KG, Firsch DJ, et al. Four postmortem case reports with quantitative detection of the synthetic cannabinoid, 5F-PB-22. J Anal Toxicol. 2014;38(8):559-62.
- [20] Kovacs K, Toth AR, Kereszty EM. A new designer drug: methylene related death. Orv Hetil 2012;153:271-6.
- [21] Cawse BM, Levine B, Jufer RA, et al. Distribution of methylene in four postmortem cases. J Anal Toxicol. 2012;36:434-9.
- [22] Pearson JM, Hargraves TL, Hair LS, et al. (2012) Three fatal intoxications due to methylene. J Anal Toxicol. 2012;36:444-451.
- [23] Torrance H, Cooper G. The detection of mephedrone (4-methylmethcathinone) in 4 fatalities in Scotland. Forensic Sci Int. 2010;202(1-3):e62-e63.
- [24] New psychoactive substances in Europe. An update from the EU Early Warning System. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. March 2015, 12pp.
- [25] Goullé JP, Guerbet M. Les grands traits de la pharmacocinétique du delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) ; les nouveaux cannabinoïdes de synthèse ; le cannabis et la sécurité routière. Bull Acad Natl Med. 2014;198(3):541-57.
- [26] Jouanous E, Lapeyre-Mestre M, Micallef J, French Association of the Regional Abuse and Dependence Monitoring Centres (CEIP-A) Working Group on Cannabis Complications. Cannabis use: signal of increasing risk of serious cardiovascular disorders. J Am Heart Assoc. 2014;3(2):e000638.
- [27] Hodcroft CJ, Rossiter MC, Buch AN. Cannabis-associated myocardial infarction in a young man with normal coronary arteries. J Emerg Med. 2014;47(3):277-81.
- [28] Gunawardena MD, Rajapakse S, Herath J, Amarasekera N. Myocardial infarction following cannabis induced coronary vasospasm. BMJ Case Rep. 2014 Nov 12;2014. pii: bcr2014207020.
- [29] Casier I, Vanduyndhoven P, Haine S, et al. Is recent cannabis use associated with acute coronary syndromes? An illustrative case series. Acta Cardiol. 2014;69(2):131-6.
- [30] Wolff V, Armspach JP, Lauer V, et al. Cannabis-related stroke: myth or reality? Stroke. 2013;44(2):558-63.
- [31] Ince B, Benbir G, Yuksel O, et al. Both hemorrhagic and ischemic stroke following high doses of cannabis consumption. Presse Med. 2015;44(1):106-7.
- [32] Wolff V, Armspach JP, Beaujeux R, et al. High frequency of intracranial arterial stenosis and cannabis use in ischaemic stroke in the young. Cerebrovasc Dis. 2014;37(6):438-443.
- [33] Perspectives on drugs. Synthetic cannabinoids. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 2015, 7pp.
- [34] Beck F, Richard JB, Guignard R, et al. Les niveaux d'usage des drogues illicites en France en 2014. Observatoire français des drogues et toxicomanies. 3 avril 2015, 7pp.

Cannabis : les nouveaux défis du biologiste

Jean-Michel Gaulier^a

RÉSUMÉ

Le cannabis est aujourd'hui un produit de grande consommation, spécialement en France. En conséquence, le biologiste se trouve confronté à des demandes croissantes concernant le dépistage et le suivi du sevrage des consommateurs. De plus, de nouvelles questions de santé publique émergent, telles que celle concernant l'exposition des enfants des parents consommateurs. Ce manuscrit propose d'évoquer les outils analytiques à même de répondre à ces questions, et d'évoquer les écueils de l'interprétation des résultats.

Cannabis – exposition – prélèvement capillaire – sevrage – enfant.

SUMMARY

Cannabis : new challenges for biologist

Today, cannabis derivatives are products of general consumption, especially in France. Consequently, biologists are facing with an increase of requests about screening test for cannabis, and monitoring the withdrawal process of consumers. In addition, new questions related to public health are arising (i.e. regular exposure of children of parents who consume cannabis). The aim of this manuscript is to set out the available analytical tools, and the pitfalls of the interpretation.

Cannabis – exposure – capillary sampling – withdrawal – children.

1. Cas clinique

Amanda est une fillette de 2 ans qui est gardée au domicile parental par sa grand-mère. En cette fin de matinée, Amanda est brutalement somnolente et titube. Sa grand-mère l'amène aux urgences. Le bilan toxicologique urinaire (dépistage immunochimique) révèle la présence de cannabinoïdes dans l'urine de l'enfant. Ce test de dépistage présente très peu de faux positifs (moins de 0,5 %) qui sont généralement dus à la présence d'AINS (acide niflumique, notamment) [1].

Dans le contexte, une confirmation de ce résultat positif est mise en œuvre, dans le sang et l'urine, à l'aide d'une méthode de chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (CG-SM). Ces analyses confirment la présence d'acide nor 11 Δ^9 - tétrahydrocannabinol-9 carboxylique (THC-COOH), principal métabolite du Δ^9 - tétrahydrocannabinol (THC), principal cannabinoïde actif du chanvre indien, dans l'urine (554 $\mu\text{g/L}$) et dans le sérum (135 $\mu\text{g/L}$). L'hypothèse d'une exposition passive est écartée. Effectivement, le THC est peu présent dans la fumée des joints (car notamment largement détruit par la combustion) et si l'exposition passive existe, elle est limitée. Les données de la littérature indiquent effectivement qu'elle peut au plus et dans des conditions d'exposition importante, donner lieu à des concentrations urinaires maximales de THC-COOH de l'ordre de 10 à 15 $\mu\text{g/L}$ [2].

Dans les heures qui suivront, la grand-mère va admettre que les parents d'Amanda sont consommateurs de chanvre indien, et que la fillette a probablement pu grignoter les « barrettes de shit » qui traînaient sur la table de la cuisine familiale...

Le chanvre indien (cannabis) est aujourd'hui un produit de grande consommation, et la situation précédente qu'il est possible de qualifier « d'exposition accidentelle aigue d'origine domestique » d'un enfant n'est plus rare [3]. Le cannabis est effectivement la substance illicite la plus consommée en Europe et en France, notamment chez les adolescents et les jeunes adultes [4], et les risques liés à son usage sont clairement fonction du mode et de la fréquence de consommation [5].

2. Généralités - Rappels

Le chanvre (*Cannabis sativa* L.) est une plante herbacée annuelle, de la famille des Cannabacées. Un consensus est aujourd'hui majoritairement admis sur l'existence d'une espèce unique possédant de nombreuses variétés. Cette espèce initialement dioïque, possède des feuilles caractéristiques, découpées en 5 à 7 segments lancéolés, dentelés et disposés en éventail. Elles portent des poils sécréteurs d'une résine riche, notamment, en THC, principe actif psychotrope dont la teneur permet de déterminer la variété de chanvre. En France et en Europe, la limite légale de THC pour un chanvre textile est de 0,2 % rapporté à la matière sèche.

La chimie du chanvre est très complexe, avec plus de 500 composés naturels identifiés, parmi lesquels il existe une classe tout à fait spécifique au genre *Cannabis* : les cannabinoïdes. Ce sont des terpénophénols dérivés du benzopyranne dont le squelette comprend 21 atomes de carbone. Il existe à ce jour une centaine de cannabinoïdes

^a UF de Toxicologie - Centre de Biologie-Pathologie
CHRU de LILLE
Bd du Pr. J. Leclercq - CS 70001
59037 LILLE Cedex, France

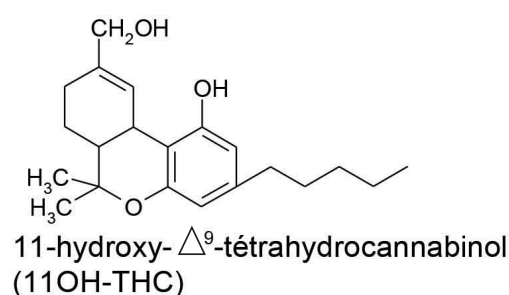
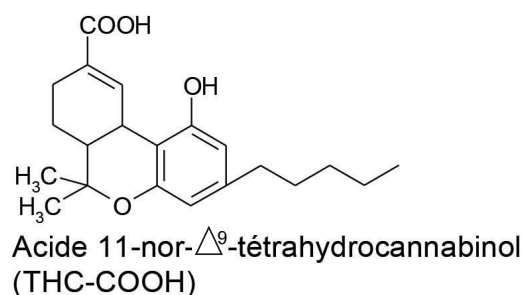
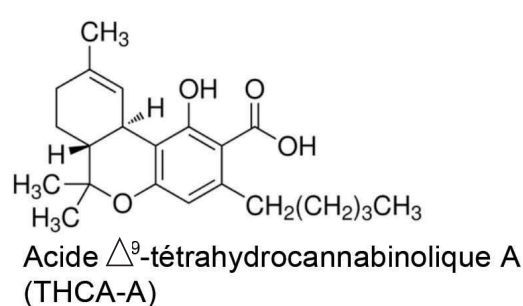
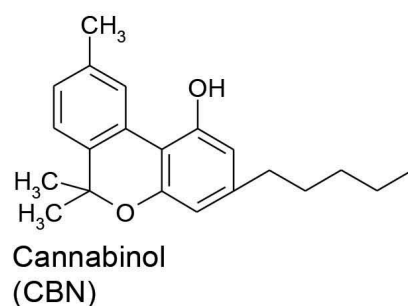
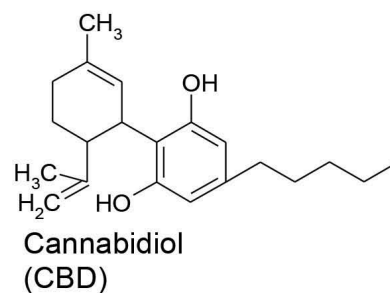
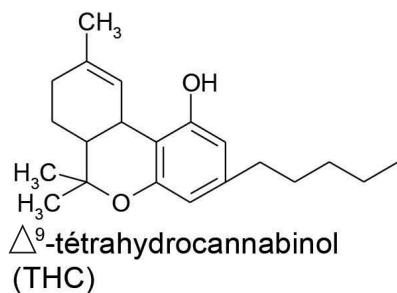
* Correspondance

jean-michel.gaulier@chru-lille.fr

article reçu le 14 août, accepté le 30 septembre 2015

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 1 – Principaux cannabinoïdes et métabolites.



identifiés, appartenant à une dizaine de types différents suivant leur structure. Les principaux représentants de cette classe sont le THC, le cannabidiol (CBD), le cannabinol (CBN), et l'acide Δ^9 -tétrahydrocannabinolique A (THCA-A) (figure 1). Le THC est donc le « principe actif » du chanvre, « le psychodysléptique majeur ». Le CBD est le cannabinoïde le plus abondant dans la plante, précurseur chimique des autres cannabinoïdes. Il présente des propriétés anti-inflammatoires et sédatives. Le CBN est le produit ultime de dégradation des cannabinoïdes dans la plante. Il serait pourvu de propriétés anti-inflammatoires. Enfin, le THCA-A est un précurseur inactif du THC, présent en quantité supérieure à celui-ci dans la plante fraîche. Il est partiellement converti en THC par décarboxylation sous l'effet de la chaleur, par exemple lors de la combustion d'un joint. La décarboxylation étant incomplète, ce cannabinoïde est retrouvé dans le sérum et les urines des consommateurs de cannabis mais en concentrations faibles comparées à celles du THC et du

THC-COOH, et principalement lorsque la consommation est très récente.

Ces cannabinoïdes sont principalement retrouvés dans la résine des sommités fleuries et leur concentration varie en fonction de facteurs génétiques et environnementaux. Le cannabis est consommé sous 3 formes :

- l'herbe, constituée principalement par les feuilles et sommités fleuries, séchées (et souvent pulvérisées). En France, la teneur moyenne en THC de l'herbe semble en augmentation : en 2013, elle est de 13 % [4].

- La résine qui peut être récoltée simplement en frottant les sommités des plantes femelles entre les mains, mais très généralement produite par compression (« barrette de shit ») : additionnée de poudre provenant des plants séchés et/ou de paraffine et/ou de cirage et/ou de pollen et/ou de henné et/ou de colle et/ou d'autres ingrédients..., cette résine est pressée en petits blocs durs, bâtonnets ou plaquettes de couleur brun noir à vert jaune selon les régions de production. C'est la présentation

la plus commune du cannabis compte tenu de la facilité de manipulation (et donc de trafic) de cette forme. La teneur en THC est très variable selon l'origine de la résine et son mode de préparation. En France, les saisies de résine révèlent une teneur moyenne de l'ordre 17,4 % [4].

- L'huile, forme mi-liquide/mi-solide pouvant être obtenue, par exemple, à partir de la macération des parties résineuses de la plante dans un solvant organique comme de l'alcool éthylique à 95°, suivie d'une concentration du filtrat par chauffage. Sa teneur en THC est variable, et peut être supérieure à 50 %.

À la suite d'une inhalation, l'absorption pulmonaire du THC est rapide. Ainsi, sa détection plasmatique est quasiment « immédiate » après la première bouffée. Le pic plasmatique est atteint sept à dix minutes plus tard. La biodisponibilité par voie inhalée varie de 2 à 56 % avec une forte variabilité intra- et inter-individuelle fonction notamment de la fréquence de consommation [6]. Par inhalation, il existe également une perte importante de THC, d'une part par pyrolyse lors de la combustion, et d'autre part moindre dans la fumée dite « secondaire » qui n'est pas inhalée [7].

En cas d'ingestion, le THC est facilement résorbé du fait de sa lipophilie, mais celle-ci est plus lente que l'absorption pulmonaire. De plus, les pics plasmatiques (T_{max} de l'ordre de 3 heures) sont plus faibles car le THC semble subir une dégradation dans l'estomac et un effet de premier passage hépatique important. Au total, la biodisponibilité du THC par voie orale varie de 4 à 20 % [8].

Dans le plasma, 95 à 99 % du THC sont liés aux protéines plasmatiques, principalement à des lipoprotéines. Le THC est une molécule extrêmement lipophile. Il va rapidement atteindre les tissus hautement vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie. Cette forte fixation tissulaire, associée au métabolisme hépatique, entraîne une diminution rapide des concentrations plasmatiques de THC après arrêt de l'administration. Le tissu cérébral, riche en lipides et siège de l'activité psychotrope du THC, est un lieu privilégié de stockage de celui-ci. Le tissu adipeux accumule le THC plus lentement, du fait d'une vascularisation moins importante, mais constitue donc également un territoire de stockage.

Le volume de distribution (V_d) du THC à l'état d'équilibre est estimé à environ 10 L/kg, ce qui illustre son importante fixation tissulaire et justifie que les concentrations sanguines ne reflètent pas l'imprégnation tissulaire en THC [7].

Chez la femme enceinte, le THC franchit la barrière fœto-placentaire (le THC est également retrouvé dans le lait maternel) et les concentrations plasmatiques du fœtus et de la mère sont similaires, même s'il existe probablement une variabilité importante [9]. Il est possible de mettre en évidence du THC-COOH chez le nouveau-né de mère consommatrice, notamment dans le méconium [8].

Le métabolisme du THC, et des cannabinoïdes en général, est complexe. Il existe environ une centaine de métabolites pour le seul THC [10]. La principale voie de métabolisation du THC consiste, en premier lieu, en une hydroxylation microsomiale, préférentiellement sur la position 11, conduisant

au 11-hydroxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (11OH-THC) métabolite au moins aussi actif que le THC lui-même [11]. Ce métabolisme fait intervenir les CYP2C9 et 3A4 [12,13]. Le 11OH-THC est lui-même rapidement oxydé en THC-COOH inactif. Cette réaction s'effectue probablement en deux étapes avec pour intermédiaire un dérivé aldéhydique, par action successive d'une alcool déshydrogénase, puis d'une aldéhyde déshydrogénase [8,14]. Quand le THC est inhalé, la concentration plasmatique de 11OH-THC demeure toujours inférieure à celle du THC. L'inverse est constaté en cas d'ingestion car la majorité du THC est rapidement hydroxylée en 11OH-THC par les enzymes microsomiales de la muqueuse intestinale. Dans les deux cas, le THC-COOH devient rapidement le composé plasmatique majoritairement retrouvé dans le sang et l'urine [7].

Le métabolisme de phase II du THC-COOH implique principalement une conjugaison avec l'acide α -D-glucuronique par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) 1A1 et 1A3 [15,16]. Ce conjugué (THC-COO-glucuronide), plus hydrophile que le THC-COOH, est le métabolite urinaire majoritaire du THC.

L'élimination est lente, essentiellement due à la libération progressive du THC et de ses métabolites dans le sang à partir des territoires de stockage comme le tissu adipeux [6]. L'élimination est principalement biliaire (65-80 %) et secondairement urinaire (20-35 %) sous forme de métabolites acides [8,17].

3. Mise en évidence d'une consommation de cannabis

Les analyses sanguines (recherche et/ou dosage) concernant les cannabinoïdes et leurs métabolites reposent sur l'utilisation de méthodes chromatographiques : CG-SM après dérivation, ou, plus fréquemment actuellement, chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

Dans le sang, les concentrations de THC demeurent détectables généralement 6 à 12 heures après l'inhalation d'une dose moyenne (d'avantage parce que le produit diffuse bien et s'accumule, plutôt que parce qu'il a été éliminé) chez un consommateur occasionnel (une consommation/semaine), et au minimum 24 à 48 heures plus tard chez un consommateur régulier (10 consommations au cours des 30 derniers jours).

Le THC-COOH est encore détectable dans le sang de 24 à 48 heures dans le cas d'un consommateur occasionnel, et au-delà de 48 heures chez un consommateur régulier. Ainsi, du THC et du THC-COOH peuvent être présents dans le sang à des concentrations significatives plus de 7 jours après un sevrage [18].

Le 11OH-THC présente des concentrations sanguines qui suivent grossièrement les cinétiques les plus courtes (6 heures ou 24 heures) que celles du THC, avec les caractéristiques précédemment évoquées : si le cannabis a été fumé, les concentrations sanguines de 11OH-THC restent inférieures à celles de THC ; si le cannabis a été ingéré, les concentrations sanguines de 11OH-THC sont généralement supérieures à celles de THC.

Par contre, il semblerait que le 11OH-THC puisse être présent plusieurs jours dans le sang d'un consommateur régulier.

Dans l'urine, les méthodes immunochimiques de dépistage de la prise de cannabis reposent généralement sur l'utilisation d'un anticorps anti-THC-COOH avec un cut-off de positivité de 50 µg/L. Les méthodes de confirmation (recherche et dosage) sont les méthodes chromatographiques applicables dans le sang.

Dans l'urine, le composé majoritaire est le THC-COOH, principalement sous forme glucuroconjugué. Le 11OH-THC est également présent dans l'urine sous forme glycuconjuguée (environ 2 % de la dose). Le THC est présent à l'état de traces, et difficilement détectable ou seulement dans les toutes premières heures qui suivent la prise. Après la prise d'une dose unique de THC, le dépistage urinaire est en général positif dès la 2^e heure, et va le demeurer généralement pendant 5 à 7 jours, mais parfois jusqu'à 12 jours [6,7]. Dans le cas de consommations répétées de cannabis, la durée de détection du THC-COOH urinaire (après arrêt de la consommation) augmente d'autant que cette consommation chronique était importante et prolongée, et peut aller jusqu'à plus de 2 mois [19]. Enfin, comme indiqué précédemment, l'exposition passive peut, au plus et dans des conditions d'exposition importante, donner lieu à des concentrations urinaires maximales de THC-COOH de l'ordre de 10 à 15 µg/L, qui en théorie, ne peuvent pas donc positiver un test immunochimique de dépistage urinaire [2]. À la suite de prises répétées de chanvre indien, le THC et ses métabolites (en particulier, le THC-COOH), sont détectables dans les cheveux. En effet, ces substances sont transférées du sang vers le bulbe pileux, puis la racine pileuse, et s'incorporent ainsi dans la partie aérienne du cheveu, c'est-à-dire la tige pileuse. Le délai entre la prise de chanvre indien et l'apparition des cannabinoïdes et de leurs métabolites dans la tige pileuse est en général supérieur à 72 heures. Le THC est la substance normalement retrouvée aux concentrations les plus élevées : de 0,1 à une dizaine de ng/mg de cheveux. Mais il est également habituellement retrouvé d'autres cannabinoïdes : le cannabinoïde (CBN) et le cannabidiol (CBD) de 0,1 à quelques ng/mg de cheveux.

Les métabolites du THC sont retrouvés à des concentrations capillaires plus faibles : 0,01 à 0,20 ng/mg de cheveux pour le 11OH-THC, et 0,05 à 10 pg/mg de cheveux pour le THC-COOH. La relation dose de cannabis consommée/concentrations capillaires de THC ou de ses métabolites, est sujette à de grandes variabilités interindividuelles. Par conséquent, il est toujours difficile d'interpréter ces concentrations dans les cheveux.

Il existe deux approches analytiques pour réaliser ces d'investigations capillaires : (i) rechercher et/doser le THC, le Cannabinoïde (CBN) et le Cannabidiol (CBD) par CG-SM, (ii) rechercher et/ou doser le THC-COOH par chromatographie gazeuse avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CG-SM/SM). Mais depuis peu, une méthode d'analyse simultanée du THC, du THC-COOH, du CBD et du CBN, sans étape de dérivation, par chromatographie liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) est disponible, et permet de combiner ces 2 approches [20].

En ce qui concerne le THC, lorsque sa concentration dans les cheveux, ainsi que celles de CBD et de CBN, sont peu importantes, il existe une possibilité pour que la présence de ces cannabinoïdes dans ces phanères soit due à une contamination externe (fumée de joints, ou transfert manuporté de la chevelure par une tierce personne ayant préalablement manipulé du cannabis,...) et ceci, y compris lorsque les cheveux sont décontaminés après prélèvement et avant analyse. Pour pallier ce risque de faux positif, trois sociétés savantes, la SFTA (Société Française de Toxicologie Analytique), la GTFCh (Société Allemande de Toxicologie Analytique) et la SoHT (*Society of Hair Testing*) ont défini la valeur de 0,1 ng/mg de cheveux comme étant la concentration seuil de THC au-delà de laquelle un résultat doit être considéré comme positif. En fait, c'est la présence capillaire de THC-COOH qui constitue la preuve d'une consommation active de cannabis [21-23] (voir *infra*). Par ailleurs, et même si la relation dose/concentrations reste discutable, il a été proposé les bases d'interprétation suivantes chez les consommateurs [24] : chez les fumeurs occasionnels (un joint par semaine), les concentrations de THC dans les cheveux seraient généralement inférieures à 0,3 ng/mg, chez les fumeurs modérés (plus d'un joint par semaine à un joint par jour) les concentrations de THC dans les cheveux pourraient être de l'ordre de 0,3 à 1 ng/mg, une concentration capillaire de THC supérieure à 1 ng/mg suggérerait une consommation importante (plusieurs joints par jour).

Enfin, chez de très gros consommateurs de chanvre indien, un relargage de THC stocké dans l'organisme pourrait être parfois responsable de la contamination des cheveux par ce principe actif, alors même que la personne ne consomme plus cette drogue [25].

En ce qui concerne le THC-COOH, sa présence de ce métabolite dans les cheveux (à une concentration généralement supérieure à 0,2 pg/mg) est donc la conséquence d'une consommation effective de chanvre indien [23]. Par conséquent la présence de THC-COOH dans les cheveux constitue le seul moyen de différencier une contamination externe d'une prise véritable. Ce marqueur ne permet pas cependant de s'affranchir de tous les problèmes puisque si la prise de chanvre indien est très faible ou très irrégulière, les concentrations de THC-COOH dans les cheveux sont alors très faibles, au point d'être parfois indétectables [26,27], y compris avec des méthodes très performantes. Au total, dans le cas d'une recherche de THC-COOH, il ne semble pas exister de risque de faux positifs, mais il existe un faible risque de faux négatifs pouvant correspondre soit à la prise d'une dose très faible de chanvre indien, soit à un usage qui n'est pas régulier [28].

Le dépistage salivaire est possible (plusieurs tests unitaires immunochimiques, de seuils de positivité variables, sont disponibles sur le marché), mais en raison de nombreuses limitations, leur usage est réservé au « dépistage de masse ». Les données essentielles dans la salive sont les suivantes [29-31] : le THC qui est décelé dans la salive correspond à celui qui est séquestré au niveau buccal (dentaire,...) lorsque l'utilisateur consomme du chanvre indien

par voie inhalée : à titre indicatif, des concentrations supérieures à 1 000 µg/L peuvent être décelées dans les 10 à 15 min qui suivent l'inhalation. La concentration du THC dans la salive décroît rapidement, au point d'être inférieure à 10 µg/L environ 2 heures après avoir fumé. Ces concentrations de THC dans la salive ne sont que temporellement corrélées aux concentrations sanguines, et une variabilité trop importante ne permet pas de prédire une concentration sanguine à partir d'une concentration salivaire [32].

Du THC peut être présent dans la salive à des concentrations significatives à la suite d'une exposition passive [33,34]. Le THC, et le THC-COOH passent du sang vers la salive, mais à des concentrations très faibles : généralement inférieures à 0,5 µg/L en ce qui concerne le THC-COOH [35-36]. Chez des consommateurs réguliers, le THC-COOH peut perdurer dans la salive plus de 48 heures, mais à des concentrations généralement inférieures à 0,1 µg/L [37].

4. Suivi de sevrage

L'évaluation du suivi d'un sevrage cannabis demeure problématique et « débattue ». Comme évoqué précédemment, lors d'un sevrage, l'organisme du consommateur va donc se « détoxifier ». Son organisme va donc éliminer des cannabinoïdes et métabolites à des concentrations « relativement faibles, mais significatives ».

Le THC et ses métabolites peuvent demeurer présents dans le sang plus de 7 jours après un sevrage [19,38]. Ainsi et par exemple, à la suite d'un arrêt avéré, il est possible de retrouver à J4, J5 et J7 respectivement les concentrations sanguines (en µg/L) suivantes : THC (1,7 ; 2,4 et 1,1), 11OH-THC (1,1 ; 1,4 et 0,7), THC-COOH (131 ; 47 et 23) [39].

Dans les urines, les concentrations de cannabinoïdes et métabolites demeurent importantes, et suffisantes pour positiver les tests immunochimiques de dépistage, pendant plusieurs semaines [8,40-42]. Du THC et du 11OH-THC peuvent être décelés également pendant plusieurs jours, jusqu'à 24 jours [42].

Dans les cheveux, il semblerait qu'un relargage de THC puisse être observé [25].

Il existe très peu de publications traitant du sujet de ce suivi, et donc de la possibilité de la détection d'une nouvelle consommation.

Certains auteurs suggèrent une nouvelle consommation lorsque les concentrations urinaires de THC-COOH sont supérieures à 20 ou 50 µg/L [43-45].

Une étude assez ancienne propose d'utiliser le moyen suivant : mesure urinaire du THC-COOH par immunochimie, rapport des concentrations urinaires de THC-COOH à la créatinine urinaire, ratio de ces rapports d'une urine par rapport à la suivante (délai > 24 h). Un ratio supérieur à 1,5 serait alors signe d'une nouvelle consommation (0,1 % de faux positifs et 24 % de faux négatifs) [46].

Une série d'études de la NIDA propose des « outils » similaires, mais en tenant compte des délais séparant les 2 recueils d'urine, sur les bases suivantes [47,48] : mesure urinaire des concentrations (formes non conjuguées + conjuguées) de THC-COOH par CG-SM

(6 sujets / 955 urines / cut-off de THC-COOH de 6 ou 15 µg/L), rapport des concentrations urinaires de THC-COOH à la créatinine urinaire, ratio de ces rapports (24 322 ratios calculés, d'une urine par rapport à la suivante, en fonction des délais. Les auteurs proposent comme seuil de décision, soit le ratio maximum observé lors de leur étude, soit le seuil à 95 % de leurs observations.

Une étude plus récente de la même équipe [49] propose la même approche, mais avec une modélisation : modèle mono-exponentiel avec 2 paramètres (rapport de la concentration urinaire en THC-COOH à la créatinine urinaire de la première urine ; délais entre les 2 prélèvements urinaires) basé sur l'algorithme de Marquardt-Levenberg : mesure urinaire des concentrations (formes non conjuguées + conjuguées) de THC-COOH par CG-SM (48 sujets - 2 377 urines pour la modélisation / 68 sujets - 1 100 urines pour la validation du modèle / cut-off de THC-COOH de 2,5 µg/L) sur 30 jours, rapport des concentrations urinaires de THC-COOH à la créatinine urinaire. Leur modèle permet de fixer un ratio au-delà duquel une nouvelle consommation est suggérée. Toutefois, ils proposent des « règles » additionnelles d'utilisation afin de limiter les faux positifs...

Autrement dit, à ce jour, aucune méthode basée sur des analyses urinaires ne présente des arguments franchement convaincants pour utilisation robuste et fiable en routine. L'utilisation d'analyse capillaire (en particulier le dosage capillaire du THC-COOH) pourrait constituer une approche intéressante dans le suivi de sevrage. En cas de sevrage, les cannabinoïdes et leurs métabolites doivent logiquement devenir indétectables dans les cheveux. C'est là, d'ailleurs, une application actuelle des analyses capillaires dans le cadre de la procédure de restitution du permis de conduire [50]. Néanmoins, des études pilotes prospectives complémentaires et préalables à l'utilisation de ce moyen diagnostique en routine sont nécessaires.

5. Exposition des jeunes enfants de parents consommateurs

La forte proportion de consommateurs réguliers de cannabis dans la tranche des 18-34 ans pose le problème de l'exposition de l'entourage proche de ces derniers, et notamment de leurs enfants. En effet, d'une part ceux-ci subissent une exposition environnementale chronique (fumées toxiques, transfert manuporté...), et d'autre part, ils encourent des risques d'exposition chronique par ingestion directe des résidus de produits cannabiques (résine, « space cakes » ...) [3].

En pratique, 3 situations dont les conséquences sanitaires/cliniques diffèrent (mais restent à définir) sont à distinguer, suivant le degré de l'exposition chronique des enfants : une exposition environnementale faible, une exposition environnementale forte, une exposition environnementale forte avec absorption significative par l'organisme de l'enfant.

Compte tenu du peu de données dans la littérature dans ce domaine, la recherche de cannabinoïdes dans les cheveux de ces enfants exposés apparaît comme un

moyen potentiellement intéressant de distinguer ces trois situations. Les substances à rechercher dans ce contexte sont le THC, le THC-COOH, le CBN et le CBD ; comme vu précédemment, la preuve d'une consommation active de cannabis chez l'adulte étant basée sur la détection capillaire du THC-COOH, témoin d'une absorption significative du THC par l'organisme. [20].

La transposition de l'interprétation de ces résultats, de l'adulte, consommateur ou non, à l'enfant exposé est délicate car plusieurs difficultés supplémentaires sont à prendre en compte dans cette population pédiatrique :

- le risque de sous-estimation de l'exposition d'une part en raison de l'immaturité enzymatique, notamment de celle des cytochromes du complexe P450 impliqués dans la conversion du THC en THC-COOH dans les premiers mois de la vie (risque de faux négatifs). L'ontogenèse de ces enzymes, qui consiste à décrire leur maturation progressive au cours de la vie d'un individu, a été étudiée et sous-tend l'idée qu'il existe une variabilité pharmacocinétique en fonction de l'âge de l'individu [51]. Ainsi et d'une façon générale, les enzymes de phase I et de phase II sont moins actives chez le fœtus et le nouveau-né que chez l'adulte. Le CYP 2C9 fait partie des CYP d'expression néonatale, dont l'activité augmente après la naissance pour atteindre progressivement les niveaux de l'adulte : le niveau d'activité des enzymes de la famille CYP2C est quasiment nul à la naissance pour atteindre environ 30 % de celle de l'adulte à l'âge d'un an.
- Le risque de surestimation de l'exposition d'autre part :
 - (i) par l'exposition *in utero* qui semble pouvoir être à l'origine de la présence de THC-COOH dans les cheveux, indépendamment de toute exposition après la naissance (faux positifs) [52]. De surcroît, cette exposition *in utero* est assujettie à une variabilité [9].

- (ii) L'immaturité enzymatique peut également être en cause, dont celle des UGT (UDP-glucuronyltransférase) car une moindre glucuronidation du THC-COOH pourrait être à l'origine de son passage facilité dans les cheveux (augmentation des concentrations capillaires de THC-COOH par rapport à l'adulte, à doses de THC égales).

- (iii) Les cheveux de l'enfant sont plus fins et plus poreux que ceux de l'adulte [52] ce qui soulève la possibilité d'une contamination externe facilitée et plus importante que chez l'adulte, notamment par les fumées ou par transfert par des mains contaminées. Bien que ce phénomène n'ait pas fait l'objet d'études spécifiques, il semble donc nécessaire de prendre des précautions supplémentaires chez l'enfant lors des étapes pré-analytiques de décontamination des échantillons capillaires, et lors de l'interprétation des résultats des analyses.

Dans ce contexte, CANHAIRKID est une étude multicentrique prospective observationnelle ayant pour objectif d'évaluer la performance diagnostique de la recherche capillaire des principaux cannabinoïdes (THC, cannabinoïde et cannabidiol) et du THC-COOH, principal métabolite du THC, dans le diagnostic de l'exposition de l'enfant au cannabis [53]. Cette étude repose sur la réalisation de prélèvement de cheveux dans un contexte de prise en charge médicale d'enfants liée à une suspicion d'exposition au cannabis (signes cliniques suggé-

rant une intoxication aiguë au cannabis et/ou contexte de consommation parentale de cannabis). La stratégie d'analyse repose sur la réalisation d'analyses (excluant les périodes d'intoxication aiguë, lorsqu'elles sont documentées) globales, ou segmentaires lorsque la quantité et la longueur des cheveux le permettent. L'évaluation de la performance diagnostique est réalisée par la confrontation des résultats des analyses capillaires avec les données cliniques, et en particulier avec le score CAST (Cannabis Abuse Screening Test) du (des) parent(s) usager(s) lorsqu'il est disponible.

Sur le plan réglementaire, les prélèvements capillaires n'entrent pas dans le champ de la loi de bioéthique. En conséquence, ce prélèvement n'est pas un prélèvement biologique au sens de cette loi, et ne nécessite ni non opposition, ni consentement. Ainsi, dans le cadre de cette étude observationnelle avec données anonymisées de façon irréversible une fois les résultats rendus aux prescripteurs, ce prélèvement non invasif réalisé sur prescription médicale, place cette étude hors champ de la recherche biomédicale au sens de la loi de Santé publique du 9 août 2004 (avis favorable n°160-2014-27 en date du 25 novembre 2014 du comité d'éthique local du CHU de Limoges).

Les résultats préliminaires de cette étude concernent 22 enfants : les cheveux de 2 enfants sont exempts de cannabinoïdes et de THC-COOH ; il a été décelé des cannabinoïdes, mais pas de THC-COOH chez 10 enfants (pour 2 d'entre eux, la concentration capillaire en THC est toutefois supérieure à 1 ng/mg de cheveux) ; dans les cheveux de 10 enfants, il a été décelé du THC-COOH accompagné de cannabinoïdes, en particulier de THC à des concentrations significatives [54].

Ces résultats préliminaires confortent des observations préalables [55] : la présence de THC-COOH associée à une concentration de THC supérieure à 1 ng/mg de cheveux pourrait correspondre à une exposition chronique importante au cannabis avec absorption significative de THC par l'organisme de l'enfant.

Ces premières constatations confortent l'idée de l'intérêt du dosage des cannabinoïdes dans les cheveux de ces jeunes enfants dans ce contexte. Toutefois, la mise en place d'autres études centrées sur l'exposition des jeunes enfants de parents consommateurs de cannabis est nécessaire, afin d'évaluer la place des analyses capillaires dans cette application et d'en préciser les règles d'interprétation dans cette population particulière.

6. Conclusion

Le cannabis est aujourd'hui un produit de grande consommation. Le biologiste se trouve confronté à des demandes croissantes concernant le dépistage et le suivi du sevrage des consommateurs. De plus, de nouvelles questions de santé publique émergent, telles que celle concernant l'exposition des enfants des parents consommateurs. Les outils analytiques à même de répondre à ces questions existent, mais l'interprétation des résultats demeure délicate.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article

Références

- [1] Boucher A, Vilette P, Crassard N, et al., Urinary toxicological screening: analytical interference between niflumic acid and cannabis. *Arch Pediatr* 2009;16:1457-60.
- [2] Cone EJ, Johnson RE, Darwin WD, et al., Passive inhalation of marijuana smoke: urinalysis and room air levels of delta-9-tetrahydrocannabinol. *J Anal Toxicol* 1987;11:89-96.
- [3] Péliissier F, Claudet I, Péliissier-Alicot AL, et al., Parental cannabis abuse and accidental intoxications in children: prevention by detecting neglectful situations and at-risk families. *Pediatr Emerg Care* 2014;30(12):862-6.
- [4] OFDT, Les niveaux d'usage des drogues en France en 2014. OFDT Tendances 2015;99,8 p.
- [5] Laqueille X, Launay C, Kanit M, Les troubles psychiatriques et somatiques induits par le cannabis. *Ann Pharm Fr* 2008;66:245-54.
- [6] Grotenhermen F, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:327-60.
- [7] Goullé JP, Saussereau E, Lacroix C, Pharmacocinétique du delta-9-tétrahydrocannabinol (THC). *Ann Pharm F* 2008;66:232-44.
- [8] Huestis MA, Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. In: Pertwee RG, ed. *Cannabinoids*. New York: Springer; Handbook of experimental pharmacology, 2005;168:p 657-690.
- [9] Boskovic R, Klein J, Woodland C, et al., The role of the placenta in variability of fetal exposure to cocaine and cannabinoids: a twin study. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:942-5.
- [10] Harvey DJ, Brown NK, Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;40:533-40.
- [11] Lemberger L, Crabtree RE, Rowe HM, 11-hydroxy-9-tetrahydrocannabinol: pharmacology, disposition, and metabolism of a major metabolite of marijuana in man. *Science* 1972;177:62-4.
- [12] Bornheim LM, Lasker JM, Raucy JL, Human hepatic microsomal metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol. *Drug Metab Dispos* 1992;20:241-6.
- [13] Watanabe K, Yamaori S, Funahashi T, et al., Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes. *Life Sciences* 2007;80:1415-19.
- [14] Watanabe K, Matsunaga T, Kimura T, et al., Major cytochrome P450 enzymes responsible for microsomal aldehyde oxygenation of 11-oxo-Delta8-tetrahydrocannabinol and 9-anthraldehyde in human liver. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:516-52.
- [15] Mazur A, Licht CF, Prather PL, et al., Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in the metabolism of classic cannabinoids. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1496-504.
- [16] Stout SM, Cimino NM, Exogenous cannabinoids as substrates, inhibitors, and inducers of human drug metabolizing enzymes: a systematic review. *Drug Metab Rev* 2014;46(1):86-95.
- [17] Wall ME, Sadler BM, Brine D, et al., Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther* 1983;34:352-63.
- [18] Karschner EL, Schwilke EW, Lowe RH, et al., Implications of Plasma Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy-THC, and 11-nor-9-Carboxy-THC Concentrations in Chronic Cannabis Smokers. *J Anal Toxicol* 2009;33:469-77.
- [19] Ellis GM, Mann MA, Judson BA et al., Excretion patterns of cannabinoid metabolites after last use in a group of chronic users. *Clin Pharmacol Ther* 1985;38:572-78.
- [20] Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, et al., Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2014;236:151-56.
- [21] Consensus de la SFTA de décembre 2004. *Ann Toxicol Anal* 2004;16:229.
- [22] SoHT recommendation for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 2004;145:83.
- [23] Jurado C, Interpretation of results in hair analysis, Annual Meeting of the Society of Hair Testing, Cardiff, UK, 2007.
- [24] Eckhardt B, Cirimele V, Determination of Cannabis in Human Hair by GC/MS. Workshop of the International Society of Hair Testing, Munich, Allemagne, 1998.
- [25] Pragst F, Balikova MA, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica chimica Acta* 2006;370:17-79.
- [26] Baptista MJ, Monsanto PV, Pinho Marques EG, et al., Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-El. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci Int* 2002;128:66-78.
- [27] Uhl M, Sachs H, Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci Int* 2004;145:143-7.
- [28] Perez-Reyes M, Di Guiseppi S, Davis KH, et al., Comparison of effects of marijuana cigarettes of three different potencies. *Clin Pharmacol Ther* 1982;31:617-24.
- [29] Huestis MA, Cone EJ. Relationship of delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked cannabis. *J Anal Toxicol* 2004;28:394-9.
- [30] Kauter GF, Ramaekers JG, Schneider E, et al., Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in serum and oral fluid. *J Anal Toxicol* 2007;31:288-93.
- [31] Cone EJ, Huestis MA, Interpretation of oral fluid tests for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:51-103.
- [32] Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, et al., Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing. II. Two studies of extreme cannabis smoke exposure in a motor vehicle. *J Anal Toxicol* 2005;29:607-15.
- [33] Milman G, Barnes AJ, Schwoppe DM, et al., Cannabinoids and metabolites in expectorated oral fluid after 8 days of controlled around-the-clock oral THC administration. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:599-607.
- [34] Moore C, Coulter C, Rana S, et al., Analytical procedure for the determination of the marijuana metabolite 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid specimens. *J Anal Toxicol* 2006;30:409-12.
- [35] Day D, Kuntz DJ, Feldman M, Presley L, Detection of THCA in oral fluid by GC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 2006;30:645-50.
- [36] Milman G, Barnes AJ, Schwoppe DM, et al., Disposition of cannabinoids in oral fluid after controlled around-the-clock oral THC administration. *Clin Chem* 2010;56:1261-9.
- [37] Desrosiers NA, Lee D, Schwoppe DM, et al., On-site test for cannabinoids in oral fluid. *Clin Chem* 2012;58:1418-25.
- [38] Karschner EL, Schwilke EW, Lowe RH, et al., Do Delta9-tetrahydrocannabinol concentrations indicate recent use in chronic cannabis users? *Addiction* 2009;104:2041-8.
- [39] Mura P, Brunet B, Lebrun A, et al., Hyperémèse cannabique et élimination prolongée du THC: nos connaissances remises en question ! Congrès Annuel de la SFTA, St Malo, France, 2013.
- [40] Smith-Kielland A, Skuterud B, Mørland J, Urinary Excretion of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabinoids in frequent and infrequent drug users. *J Anal Toxicol* 1999;23:323-32.
- [41] Goodwin RS, Darwin WD, Chiang CN, et al., Urinary Elimination of 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Cannabis Users During Continuously Monitored Abstinence. *J Anal Toxicol* 2008;32:562-6.
- [42] Lowe RH, Abraham T, Darwin W, et al., Extended Urinary delta 9 Tetrahydrocannabinol Excretion in Chronic Cannabis Users Precludes Use as a Biomarker of New Drug Exposure. *Drug Alcohol Depend*. 2009;105:24-32.
- [43] Fraser AD, Worth D, Monitoring urinary excretion of cannabinoids by fluorescence-polarization immunoassay: a cannabinoid-to-creatinine ratio study. *Ther Drug Monit* 2002;24:746-50.
- [44] Fraser AD, Worth D, Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol: a delta-9-THC-COOH to creatinine ratio study #2. *Forensic Sci Int* 2003;133:26-31.
- [45] Fraser AD, Worth D, Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol. Study III. A Delta9-THC-COOH to creatinine ratio study. *Forensic Sci Int* 2003;137:196-202.

- [46] Manno JE, Ferslew KE, Manno, BR, Urine excretion patterns of cannabinoids and the clinical application of the EMIT-d.a.u. cannabinoid urine assay for substance abuse treatment. In: Dewey, WL.; Willette, RE., editors. *The Cannabinoids: Chemical, Pharmacologic, and Therapeutic Aspects*. Orlando : Harcourt Brace Jovanovich; 1984. p. 281-90.
- [47] Huestis MA, Cone EJ, Differentiating new marijuana use from residual drug excretion in occasional marijuana users. *J Anal Toxicol* 1998;33:445-54.
- [48] Smith ML, Barnes AJ, Huestis MA, Identifying New Cannabis Use with Urine Creatinine-Normalized THCCOOH Concentrations and Time Intervals Between Specimen Collections. *J Anal Toxicol* 2009;33:185-9.
- [49] Schilke EW, Gullberg RG, Darwin WD, et al., Differentiating new cannabis use from residual urinary cannabinoid excretion in chronic, daily cannabis users. *Addiction* 2011;106:499-506.
- [50] Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, et al., Intérêt de l'acquisition MS3 apportée par la technologie QTRAP : dosage simultané du Δ^9 -THC, du CBN, du CBD et du Δ^9 -THC-COOH dans les cheveux par CL-SM/SM. Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, St Malo, France, 2013.
- [51] Alcorn J, McNamara P. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part I. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:959-98.
- [52] Kintz P, Contribution of in utero drug exposure when interpreting hair results in young children. *Forensic Sci. Int.* 2014;249:314-7.
- [53] Winckel M, Gaulier JM, Etude CANHAIRKID : évaluation des analyses capillaires dans le diagnostic d'exposition significative des enfants au cannabis. Congrès de la Société de Toxicologie Clinique, Lyon, France, 2014.
- [54] Winckel M, Dulaurent S, Morichon J, et al., CANHAIRKID (évaluation des analyses capillaires dans le diagnostic d'exposition significative des enfants au cannabis) : résultats préliminaires. Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, Arcachon, France, 2015.
- [55] Dulaurent, Compagnon P, Winckel M, et al., Cannabinoids in young children hair : preliminary data from some cases. Annual meeting of the Society of Hair Testing, Bordeaux, France, 2014.

La pharmaco-toxicogénétique et ses applications médicales

Delphine Allorge^a

RÉSUMÉ

La pharmacogénétique se définit comme l'étude des variations interindividuelles, d'origine génétique, de réponse aux médicaments. Cette discipline a pour but de comprendre et surtout de prévenir l'apparition d'effets indésirables ou d'inefficacité thérapeutique survenant chez certains individus lors de la prise de doses standards de médicaments. À ce titre, la pharmacogénétique a pour but ultime l'individualisation des traitements médicamenteux, tant en termes d'efficacité que de sécurité d'emploi. Par extension, la toxicogénétique peut-être considérée comme une sous-discipline de la pharmacogénétique puisque restreinte au champ de la toxicité aiguë ou chronique, qui concerne cependant non seulement les médicaments, mais également l'ensemble des xénobiotiques auxquels l'homme est exposé. De nombreux polymorphismes génétiques, affectant les gènes codant pour des enzymes, des transporteurs, des cibles pharmacologiques ou encore des *xenosensors*, ont été décrits et leurs conséquences sur la biodisponibilité et l'effet d'un grand nombre de xénobiotiques ont été élucidées. Après un rappel des concepts généraux et des méthodes d'étude, quelques exemples d'applications médicales de la pharmaco-toxicogénétique permettront d'illustrer l'intérêt de cette discipline pour la prise en charge thérapeutique des patients, ainsi que son développement dans d'autres champs de la médecine tels que la toxicologie médico-légale.

Pharmacogénétique, Toxicogénétique, Génotypage, Phénotypage, Inefficacité thérapeutique, Toxicité, Xénobiotiques.

1. Concepts généraux

La réponse aux médicaments est extrêmement variable d'un individu à l'autre, tant sur le plan pharmacologique (efficacité) que sur le plan toxicologique (effets indésirables ou adverses). Cette iatrogénie médicamenteuse avait été montrée comme étant responsable de plus de 100 000 décès par an aux USA, la classant au 4^e rang des causes de mortalité en 1994 [1]. En France, différentes

enquêtes menées par le réseau des Centres Régionaux de Pharmacovigilance ont montré que l'incidence des hospitalisations liées à un effet indésirable médicamenteux était de l'ordre de 3,5 % [2, 3].

De nombreux facteurs environnementaux (alimentation, consommation d'alcool ou de tabac...) et physiopathologiques (âge, sexe, grossesse, obésité, inflammation, insuffisance rénale ou hépatique...) participent à cette variabilité interindividuelle de réponse aux médicaments, en modulant ou en altérant les systèmes biologiques qui contrôlent la biodisponibilité et les effets des médicaments [4]. Cependant, il est désormais clairement établi qu'une part significative de la variabilité interindividuelle de réponse aux médicaments est due à des facteurs génétiques [4, 5]. Ainsi, suivant le type de médicaments, 20 à 95 % des différences interindividuelles de la biodisponibilité et/ou des effets des médicaments sont suspectées ou démontrées comme étant d'origine génétique [6].

a Unité Fonctionnelle de Toxicologie, Service de Toxicologie-Génopathies, Pôle de Biologie-Pathologie-Génétique
CHRU de Lille & EA4483
Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine,
Université de Lille 2.
Bd. du Pr. J. Leclercq – CS70001
59037 Lille cedex

Correspondance :
d-allorge@chru-lille.fr

article reçu le 12 août, accepté le 30 septembre 2015
© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Pharmaco/toxicogenetics and its medical applications

Pharmacogenetics is defined as the study of interindividual variability, of genetic origin, in drug response. The aim of this discipline is to better understand and, furthermore, to predict the occurrence of inadequate response (adverse effects or therapeutic failure) to standard dosages of drugs in certain individuals. In this context, the ultimate goal of pharmacogenetics is the individualization of drug treatments, both in terms of efficacy and safety. By extension, toxicogenetics can be considered as a sub-discipline of pharmacogenetics, being restricted to the field of acute or chronic toxicity of drugs, but also of all xenobiotics to which humans are exposed. Numerous polymorphisms in genes encoding drug-metabolising enzymes, transporters, pharmacological targets or even xenosensors have been described and their consequences on the disposition and effects of a substantial number of xenobiotics have been elucidated. After presentation of general aspects and associated methodologies, a few examples of current medical applications of pharmaco/toxicogenetics will illustrate the relevance of this discipline for patient-tailored drug therapy, as well as its development in other medical areas, such as forensic toxicology.

Pharmacogenetics, Toxicogenetics, Genotyping, Phenotyping, Drug failure, Toxicity, Xenobiotics.

La pharmacogénétique est la discipline qui étudie les mécanismes d'origine génétique intervenant dans la variabilité interindividuelle de réponse aux médicaments, que ce soit en termes d'efficacité thérapeutique ou de survenue d'effets indésirables ou toxiques. Au-delà de la mise en évidence des facteurs génétiques impliqués dans ces anomalies de réponse aux médicaments, la pharmacogénétique a pour but ultime le développement de tests simples, applicables en routine, permettant d'identifier les individus à risque de telles anomalies de réponse, dans la perspective d'une individualisation des traitements médicamenteux. Cette discipline est relativement ancienne, le terme de « pharmacogénétique » ayant été proposé dès la fin des années 1950, à la suite de la démonstration du caractère héréditaire de réponses anormales à certains traitements médicamenteux [7]. La description du phénotype « acétyleur lent » de l'isoniazide et de son rôle dans la neurotoxicité de cet antituberculeux représente un exemple célèbre d'anomalie de réponse aux médicaments ayant largement contribué au développement de la pharmacogénétique. Depuis son émergence dans le monde de la recherche scientifique, puis son application dans le domaine médical, la pharmacogénétique a engendré un nombre croissant de sous-disciplines (nutrigénétique, écogénétique...) dont les domaines d'étude et les applications médicales potentielles s'étendent au-delà du champ de la thérapie médicamenteuse. Ainsi, la toxicogénétique peut se définir comme une sous-catégorie de la pharmacogénétique restreinte au champ de la toxicité aiguë ou chronique, non seulement des médicaments, mais également de l'ensemble des xénobiotiques (pesticides, additifs alimentaires, drogues naturelles ou synthétiques, etc.) auxquels l'homme est exposé, que ce soit ponctuellement ou en permanence, dans le cadre domestique ou encore professionnel. À ce titre, la toxicogénétique présente un intérêt potentiel dans le cadre de l'étude, voire à terme du diagnostic et de la prévention, des maladies multifactorielles d'origine environnementale ou professionnelle [8]. Son utilisation dans le domaine de la toxicologie médicolégale, notamment dans le cadre de la recherche des causes de la mort, connaît également actuellement un essor important [9]. Au-delà de cette reconnaissance du caractère héréditaire d'un grand nombre de variations de réponse aux médicaments, ou xénobiotiques en général, c'est sans conteste l'avènement de la biologie moléculaire qui a contribué à l'essor de la pharmaco-toxicogénétique et de ses applications, grâce à l'identification des gènes, puis de leur polymorphisme, impliqué dans cette variabilité interindividuelle. Depuis ces cinq dernières décennies, de très nombreux exemples d'anomalies, d'origine génétique, de réponse, notamment aux médicaments, ont ainsi été rapportés, et la nécessité de prévenir leur apparition est devenue évidente. Ces facteurs génétiques étant par essence stables, par comparaison aux facteurs environnementaux qui varient de manière permanente et plus ou moins aléatoire, leur identification chez un individu offre par conséquent la possibilité de prévoir, partiellement ou totalement, la façon dont cet individu va répondre à certains traitements médicamenteux ou encore à certains composés chimiques de l'environnement.

Prédire ou diagnostiquer une anomalie, d'origine génétique, de réponse à un xénobiotique, qu'elle soit due à une altération de sa pharmaco(-toxico)cinétique et/ou de sa pharmaco(-toxico)dynamie, est donc désormais envisageable grâce aux outils de la pharmaco-toxicogénétique.

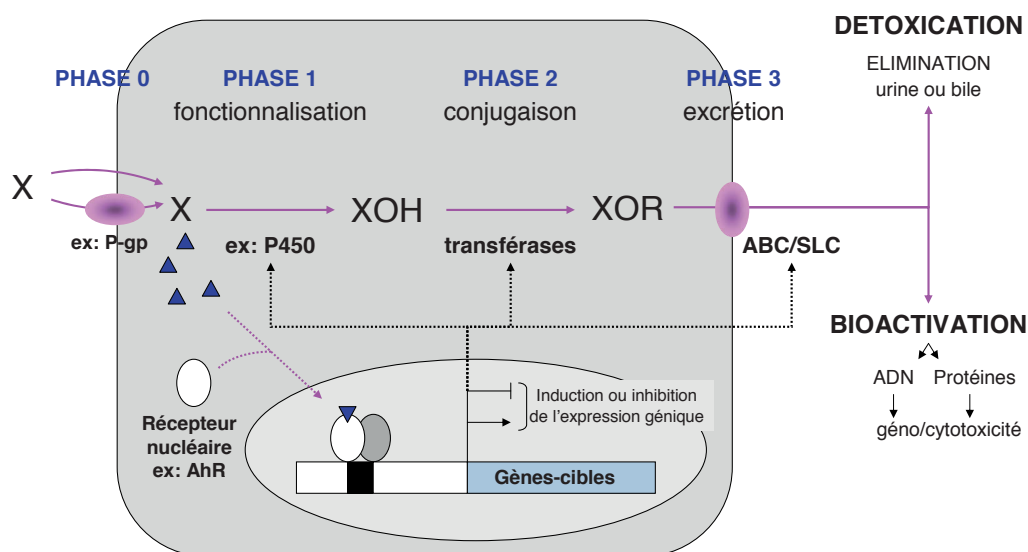
2. Mécanismes moléculaires et phénotypes associés

L'achèvement du séquençage du génome humain au début des années 2000 a confirmé le caractère hautement polymorphe de notre génome et de l'ensemble des quelque 30 000 gènes qu'il contient. Les gènes qui codent pour les protéines impliquées dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques (**figure 1**) (transporteurs et enzymes des phases 0 à 3 du métabolisme des xénobiotiques), dans la régulation transcriptionnelle de ces enzymes et transporteurs (récepteurs nucléaires et facteurs de transcription, regroupés sous l'appellation de *xenosensors*), ou encore dans leurs effets pharmacologiques ou toxiques (enzymes, récepteurs membranaires, canaux ioniques...) sont ainsi affectés par ce polymorphisme génétique.

Les deux principaux types de variation génétique affectant le génome humain, à savoir les *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) et les réarrangements génomiques complexes, ont été identifiés dans les gènes d'intérêt pharmaco-toxicogénétique [10]. Un SNP correspond à la substitution dans la séquence d'ADN d'une seule paire de bases nucléotidiques et on dénombre globalement sur le génome humain 1 SNP tous les 1 000 paires de bases. Alors qu'ils sont dans la grande majorité des cas « silencieux », c'est-à-dire sans conséquence fonctionnelle, ces SNP affectent parfois des régions géniques fonctionnellement importantes, voire cruciales, comme les séquences régulatrices ou codantes des gènes, et peuvent alors être responsables d'altérations de l'expression et/ou de l'activité des protéines correspondantes. À côté de ces SNP et des autres microlésions de l'ADN (délétion ou insertion d'une ou de quelques paires de bases par exemple), des délétions partielles ou complètes de gènes et des amplifications géniques (les duplications étant le type d'amplification génique le plus fréquent) ont également été décrites pour les gènes d'intérêt pharmaco-toxicogénétique [10]. Ces variations du nombre de copies d'un gène ou *Copy Number Variations* (CNV), qui affecte environ 12 % du génome humain, sont principalement responsables d'une perturbation du dosage génique, par perte ou gain d'information génétique, et représentent à ce titre des polymorphismes dits « quantitatifs ».

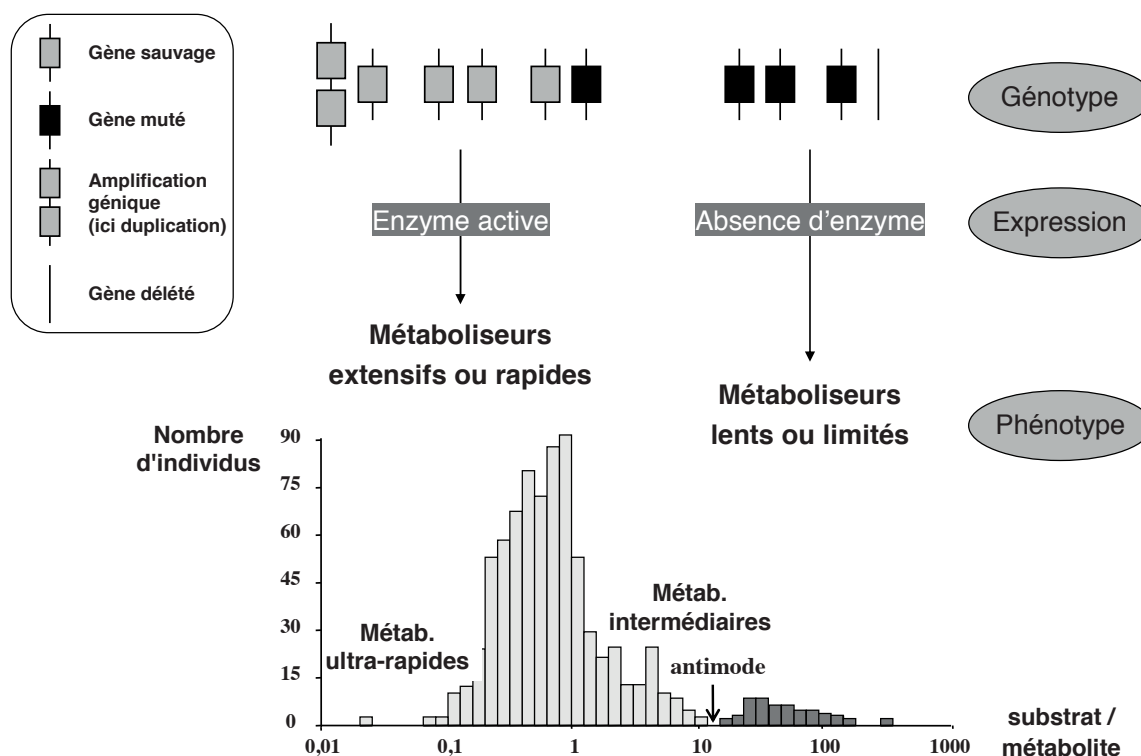
Au total, l'ensemble de ces polymorphismes génétiques est responsable d'anomalies qualitatives ou quantitatives des protéines correspondantes. Ainsi, à titre d'exemple, les SNP ou les CNV affectant les gènes codant pour les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) peuvent abolir, réduire ou encore augmenter l'expression et/ou l'activité de ces enzymes et s'expriment, par conséquent, dans la population générale sous la forme de différents phénotypes métaboliques (**figure 2**). La plupart des gènes des EMX étant portés par des autosomes, les phénotypes métaboliques correspondants sont transmis sous le mode

Figure 1 – Représentation schématique de la prise en charge cellulaire des xénobiotiques.



Le métabolisme (phases 1 et 2) et le transport (phases 0 et 3) d'un xénobiotique X sont présentés. En général, le métabolisme participe à la détoxification du xénobiotique, mais il peut parfois conduire à sa bioactivation, sous forme de métabolites géno- ou cytotoxiques. Dans le cas d'une pro-drogue, le métabolisme conduit à sa bioactivation. P-gp : Glycoprotéine P, AhR : récepteur nucléaire aux hydrocarbures aromatiques; P450 : cytochromes P450; ABC : Transporteurs membranaires de la famille des ATP-Binding-Cassette proteins; SLC : Transporteurs membranaires de la famille des Solute Carrier transporters.

Figure 2 – Expression phénotypique d'un polymorphisme génétique d'une enzyme du métabolisme des xénobiotiques dans la population générale.



L'existence d'un polymorphisme génétique affectant une enzyme du métabolisme des xénobiotiques s'exprime dans la population générale sous la forme d'au moins deux phénotypes métaboliques distincts : des métaboliseurs limités ou lents (représentant souvent une sous-population minoritaire) et des métaboliseurs extensifs ou rapides. Des métaboliseurs ultra-rapides et intermédiaires sont parfois rapportés pour certaines enzymes polymorphes. D'après [5].

autosomal récessif ou, parfois, co-dominant. Ainsi, les individus ayant un génotype homozygote sauvage présentent un phénotype « métaboliseur extensif ou rapide » (activité enzymatique normale), alors que ceux ayant un génotype homozygote muté ou hétérozygote composite présentent un phénotype « métaboliseur limité ou lent » (déficit d'activité enzymatique). L'existence de métaboliseurs dits « ultra-rapides » (augmentation de l'activité enzymatique) ou « intermédiaires » (activité enzymatique réduite) a également été démontrée pour certaines enzymes polymorphes. Il est important de noter que la fréquence de ces différents phénotypes peut être variable dans la population générale en fonction de l'enzyme considérée et, pour une même enzyme, variable en fonction de l'origine ethnique ou géographique des populations étudiées [11].

3. Méthodes d'étude

Deux grands types d'approches méthodologiques sont utilisés en pharmacotoxigénétique : les méthodes de phénotypage et les méthodes de génotypage. Si les méthodes de phénotypage sont principalement, voire exclusivement, applicables dans le domaine des polymorphismes affectant le métabolisme des xénobiotiques, les méthodes de génotypage présentent l'avantage d'être applicables à l'étude de n'importe quel gène d'intérêt pharmacotoxigénétique.

3.1 Méthodes de phénotypage

Les méthodes de phénotypage reposent soit sur des tests *in vivo* basés sur l'administration d'un substrat-test (en général un médicament), soit sur une mesure directe de l'activité enzymatique à partir d'un tissu exprimant l'enzyme d'intérêt.

Plusieurs heures après l'absorption d'une dose sub-thérapeutique d'un médicament-test (le délai est fonction de la pharmacocinétique de celui-ci), un échantillon biologique, sanguin ou urinaire le plus souvent, est recueilli et une quantification du substrat et de son (ou ses) métabolite(s) est réalisée à l'aide de méthodes chromatographiques essentiellement (HPLC, CPG...), couplées à un type de détection adapté (UV, SM...). Dans le cas le plus général, on détermine alors le rapport métabolique (RM) entre la quantité de substrat retrouvée sous forme inchangée et celle d'un (ou plusieurs) métabolite(s), ce rapport étant le reflet de l'activité enzymatique étudiée. La valeur du RM permet de classer les individus en métaboliseurs extensifs ou limités par comparaison à celle de l'antimode de distribution déterminée au préalable (de façon statistique) sur une grande population d'individus. Le phénotypage du CYP2D6 par le dextrométhorphan [12] ou celui combiné des enzymes CYP1A2, CYP2A6, N-acétyltransférase-2 et xanthine oxydase par la caféine [13] sont deux exemples de tests de phénotypage *in vivo* disponibles dans de nombreux laboratoires hospitaliers de pharmacotoxigénétique.

Lorsque l'administration directe d'un substrat-test à l'individu n'est pas envisageable, du fait d'un risque de toxicité important par exemple, ces tests de phénotypage *in vivo* peuvent être remplacés par des tests *ex vivo*, réalisés à partir d'un tissu ou de cellules facilement accessibles comme

les érythrocytes ou les leucocytes. À titre d'exemple, le phénotypage *ex vivo* de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), enzyme polymorphe impliquée dans la détoxification de médicaments à visée immunosuppressive et antinéoplasique que sont les thiopurines (azathioprine ou AZA et 6-mercaptopurine ou 6-MP), consiste en la mesure de l'activité intra-érythrocytaire de la TPMT à l'aide d'un substrat-test, en général la 6-MP. Son intérêt dans l'identification des patients à risque de développer une hématotoxicité ou, à l'inverse, à risque d'inefficacité thérapeutique, suite à l'administration de doses conventionnelles de thiopurine, sera illustré dans le chapitre suivant. En fait, cette approche par mesure directe de l'activité enzymatique serait préférable à la méthode par administration d'un médicament-test. Malheureusement, la grande majorité des enzymes présentant un intérêt en pharmacotoxigénétique, notamment les cytochromes P450, est peu ou pas exprimée dans les érythrocytes et les leucocytes.

Le phénotypage peut apparaître comme le « *gold standard* » pour déterminer le phénotype métabolique d'un individu, puisqu'il permet une mesure en temps réel de sa capacité métabolique, qui tient compte non seulement de son statut génétique, mais également des autres facteurs physiopathologiques ou environnementaux qui contribuent au phénotype de l'individu. Cependant, les méthodes de phénotypage sont actuellement essentiellement adaptées à l'étude des EMX. Par ailleurs, le phénotypage présente un certain nombre d'autres inconvénients qui en limitent l'utilisation en routine. L'absence de substrats-tests spécifiques ou la survenue d'effets indésirables liée à leur administration, la difficulté à interpréter la valeur du rapport métabolique en cas de co-administration de médicaments (interactions médicamenteuses) ou chez un individu aux fonctions hépatiques et rénales altérées, sont autant de limites à l'utilisation de ce test.

3.2 Méthodes de génotypage

Les méthodes de génotypage sont basées sur l'identification directe des anomalies génétiques à l'origine de la variabilité d'expression ou d'activité de la protéine d'intérêt, qu'elle soit une protéine de transport, une enzyme, un *xenosensor* ou encore une cible pharmacologique telle qu'une protéine réceptrice. Ces méthodes permettent ainsi, sur la base du génotype de l'individu, de prédire son phénotype.

Ces méthodes nécessitent le recueil préalable d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux, sédiment urinaire ou tout autre tissu), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique de l'individu (plus rarement l'ARN). Les stratégies de génotypage adoptées par les laboratoires de pharmacotoxigénétique dépendent souvent étroitement des outils et équipements qui y sont disponibles. Néanmoins, elles doivent avant tout tenir compte d'un certain nombre de paramètres, en particulier la nature des mutations à identifier (SNP ou CNV) et le nombre de mutations à identifier pour obtenir un taux d'efficacité de prédiction du phénotype le plus élevé possible (fonction de la fréquence des polymorphismes dans la population générale et/ou dans le groupe ethnique de l'individu étudié), si possible proche de 100 %. La stratégie adoptée tient également compte du contexte dans lequel le

test est prescrit, à savoir dans un cadre purement prédictif, avant l'introduction d'un traitement médicamenteux chez un patient par exemple (phénotype non connu *a priori*), ou dans un cadre diagnostique pour expliquer une absence de réponse à un médicament donné, un accident iatrogène ou encore une intoxication médicamenteuse aiguë (suspicion d'un phénotype déficitaire ou ultra-rapide par exemple).

Il existe désormais de très nombreuses méthodes d'analyse du polymorphisme génétique, notamment en ce qui concerne l'identification des SNP [14]. Certaines correspondent à une recherche ciblée de SNP connus (parfois désignées méthodes de typage des SNP), d'autres offrent l'avantage d'identifier des SNP connus et d'en détecter simultanément de nouveaux (méthodes de criblage). Néanmoins, l'amélioration récente des techniques de séquençage du génome, notamment grâce à leur automatisation, a considérablement facilité leur mise en œuvre en routine et diminué leur coût, favorisant ainsi ces dernières années leur utilisation directe pour l'analyse des polymorphismes pharmaco-toxicogénétiques. Différentes techniques sont également disponibles pour détecter ou identifier les réarrangements génomiques complexes du type CNV. À titre d'exemples, la PCR quantitative en temps réel ou le pyro-séquençage sont deux techniques largement utilisées pour le génotypage des CNV [14, 15].

4. Exemples d'applications médicales et médico-légales de la pharmaco-toxicogénétique

4.1. Pharmacogénétique des médicaments thiopuriniques

Les médicaments thiopuriniques que sont l'azathioprine (Imurel®), la 6-mercaptopurine (Purinéthol®) et la 6-thioguanine (Lanvis®) sont utilisés d'une part, pour leurs propriétés cytotoxiques dans le traitement de certaines leucémies (en particulier la leucémie aiguë lymphoblastique infantile), et d'autre part, pour leurs propriétés immunosuppressives dans la prévention du rejet de greffe et dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques comme la Maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde. Ces médicaments présentent un risque important de toxicité hématologique (leucopénie, thrombopénie, plus rarement aplasie médullaire potentiellement fatale), due à l'accumulation dans les tissus hématopoïétiques des métabolites actifs cytotoxiques de ces molécules, les thioguanine nucléotides, formés *via* la voie de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase [16]. Ce risque d'hématotoxicité dose-dépendante est particulièrement élevé chez les patients présentant un déficit d'activité enzymatique pour la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), enzyme impliquée dans l'inactivation des thiopurines [16]. Une relation inverse entre la concentration intra-érythrocytaire en thioguanine nucléotides et l'activité TPMT a en effet été démontrée [17]. Dans la population caucasienne, 90 % des individus présentent une activité TPMT élevée (méthyleur rapide), 10 % une activité intermédiaire (méthyleur intermédiaire) et moins de 0,5 % un déficit d'activité TPMT (méthyleur lent).

Une vingtaine d'allèles non-fonctionnels du gène de la TPMT, à l'origine d'un déficit d'activité, a été caractérisée. Le génotypage des trois SNP les plus fréquents permet de prédire le phénotype des individus avec un taux d'efficacité d'environ 95 %, et ainsi d'identifier les individus à risque d'hématotoxicité avant l'introduction d'un traitement thiopurinique. Une réduction de la posologie entre 50 et 90 % peut ainsi permettre aux patients ayant une activité TPMT, respectivement, intermédiaire ou déficitaire, de bénéficier d'un traitement par thiopurine efficace et non hématotoxique [18]. À l'inverse, certains auteurs préconisent une augmentation de la posologie usuelle des médicaments thiopuriques chez certains patients méthyleurs rapides [19]. Des rejets de greffe [20], ainsi que des échappements thérapeutiques avec rechute chez des enfants leucémiques [19], sont en effet plus fréquemment observés chez les patients présentant une activité TPMT très élevée. La détermination du génotype TPMT ne permet pas d'identifier *a priori* ces sujets au métabolisme très rapide et des auteurs recommandent donc la mesure de l'activité TPMT par phénotypage, au moins un mois après l'initiation du traitement, pour repérer ces individus [20]. Bien qu'il semble que le polymorphisme génétique de la TPMT ne permette en fait d'expliquer qu'un tiers des cas de myélosuppression observés sous traitement thiopurinique (d'autres facteurs, génétiques ou non, existent), il représente à ce jour l'un des meilleurs exemples de l'apport des tests pharmacogénétiques dans le cadre de l'aide à la thérapeutique, non seulement d'un point de vue purement clinique, mais également d'un point de vue économique [21].

4.2. Pharmacotoxigénétique des morphiniques et morphinomimétiques

Les morphiniques et morphinomimétiques sont fréquemment impliqués dans la survenue d'effets indésirables graves, voire de décès [22, 23]. En effet, la plupart sont totalement ou partiellement métabolisés par des cytochromes P450, en particulier par le CYP2D6, responsables de la synthèse de métabolites généralement plus actifs que la molécule-mère. Les métaboliseurs ultra-rapides pour le CYP2D6 présentent ainsi en général un risque accru de survenue d'effets toxiques aux morphiniques, alors que les métaboliseurs lents sont eux plus à risque d'échecs thérapeutiques [24].

4.2.1. Codéine

La codéine est un antalgique faible, utilisé dans la prise en charge des douleurs modérées ou intenses, mais également pour ses propriétés antitussives. Elle est bien absorbée par voie orale et est partiellement métabolisée par O-déméthylation par le CYP2D6 pour former la morphine, son métabolite actif. Bien que le métabolisme de la codéine en morphine par le CYP2D6 constitue une voie mineure du métabolisme de la codéine (environ 10 %), cette voie de bioactivation est essentielle pour que la codéine puisse exercer son effet analgésique. Cet antalgique est donc inefficace à doses thérapeutiques chez 5 à 10 % des Caucasiens, qui sont des métaboliseurs limités pour le CYP2D6 [25], alors qu'à l'inverse des doses thérapeutiques de codéine peuvent aboutir à un surdosage en morphine

chez 1 à 10 % des Caucasiens, qui sont des métaboliseurs ultra-rapides pour le CYP2D6 [26].

De plus, la toxicité de la codéine, *via* un surdosage en morphine, peut-être augmentée chez les métaboliseurs ultra-rapides du CYP2D6 en cas de co-administration de médicaments, tels que les macrolides et/ou les dérivés azolés, ces molécules étant des inhibiteurs puissants du CYP3A4, une autre enzyme impliquée dans le métabolisme de la codéine [26].

La codéine est fréquemment utilisée dans le *post-partum* pour les douleurs associées aux épisiotomies et aux césariennes. Bien qu'elle soit contre-indiquée au cours de l'allaitement, plusieurs cas d'intoxication sévère ont été rapportés chez des nouveau-nés allaités par des mères traitées par la codéine. Koren et al. [27] ont ainsi rapporté le cas du décès d'un nouveau-né dont la mère était traitée depuis deux semaines par 2 X 30 mg/jour de codéine. La concentration en morphine dans un échantillon de lait maternel collecté au 10^e jour était très élevée, à 87 ng/mL (les concentrations habituelles dans le lait maternel étant comprises entre 1,9 et 20 ng/mL lors de prises de 60 mg toutes les 6 heures) et la concentration plasmatique en morphine chez le nourrisson était de 70 ng/mL (pour une concentration attendue < 2 ng/mL). Ce cas dramatique a fait l'objet d'investigations complémentaires et les tests pharmacogénétiques pratiqués chez la mère et l'enfant ont montré non seulement que la mère était métaboliseur ultra-rapide pour le CYP2D6, mais aussi que la mère et l'enfant présentaient tous deux un génotype pour l'UGT2B7 prédictif d'un métabolisme ultra-rapide (*UGT2B7*2/*2*), à l'origine d'une production accrue de morphine 6-glucuronide, métabolite également très actif de la morphine [28]. Par la suite, une étude cas-témoins a confirmé que la combinaison des phénotypes «métaboliseur rapide» pour le CYP2D6 et l'UGT2B7 constitue un facteur de risque majeur de survenue de dépression centrale sévère chez les nourrissons allaités par des mères traitées par des doses conventionnelles de codéine [29].

4.2.2. Tramadol

Le tramadol est utilisé dans la prise en charge des douleurs modérées à sévères. Ses propriétés analgésiques combinent une action agoniste faible sur les récepteurs μ et une inhibition de la recapture neuronale de la noradrénaline et de la sérotonine. Les principales voies métaboliques du tramadol sont les O- et N-déméthylations, catalysées respectivement par les cytochromes CYP2D6 et CYP2B6/CYP3A4. L'O-desméthyltramadol est le métabolite présentant l'action analgésique la plus intense, du fait d'une affinité pour les récepteurs μ environ 300 fois plus élevée que celle de la molécule-mère. En conséquence, l'efficacité thérapeutique du tramadol, ainsi que sa toxicité, sont très variables selon les individus en fonction de leur génotype *CYP2D6* [30]. Comparativement aux métaboliseurs lents, les métaboliseurs ultra-rapides présentent ainsi une réponse analgésique au tramadol plus efficace, mais également un risque accru d'effets adverses. À titre d'exemples, ont été rapportés chez des métaboliseurs ultra-rapides, d'une part, un cas de dépression respiratoire grave chez un patient insuffisant rénal recevant des doses conventionnelles [31], et d'autre part, des cas de

cardiotoxicité sévère suite à une ingestion massive de tramadol [32, 33]. Dans le cadre de la toxicologie médico-légale, Levo et al. [34] ont par ailleurs démontré la très bonne concordance, dans des cas *post-mortem*, entre le rapport métabolique tramadol/O-desméthyltramadol et le génotype *CYP2D6*.

4.2.3. Méthadone

La méthadone est couramment utilisée dans la prise en charge du sevrage à l'héroïne. Elle est impliquée dans de nombreux cas d'intoxications mortelles. Les variations interindividuelles de ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques s'expliquent, en partie, par des polymorphismes génétiques affectant les protéines impliquées dans son métabolisme et son transport, mais aussi sa cible pharmacologique, les récepteurs μ [35].

Les cytochromes P450 CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 et CYP3A4 ont été identifiés comme étant les principaux P450 impliqués dans le métabolisme de la méthadone. Néanmoins, le polymorphisme génétique du CYP2B6 constituerait la principale cause de cardiotoxicité de la méthadone [36]. La méthadone est administrée sous forme de racémique et son activité pharmacologique est principalement médiée par son énantiomère (*R*). Or, le métabolisme de la méthadone par le CYP2B6 est stéréosélectif et orienté vers la prise en charge de la (*S*)-méthadone, énantiomère potentiellement cardiotoxique car capable d'inhiber les canaux potassiques du type hERG [36]. En conséquence, les individus métaboliseurs lents pour le CYP2B6 ont un risque accru de présenter des concentrations plasmatiques élevées de (*S*)-méthadone, à l'origine d'effets cardiotoxiques sévères, potentiellement létaux, du type torsade de pointe ou Long-QT [36].

De nombreux autres gènes polymorphes, codant pour des protéines impliquées dans la pharmacocinétique (comme *ABCB1* qui code pour la P-gp) et la pharmacodynamie (comme *OPRM1* qui code pour le récepteur opioïde μ) de la méthadone, sont susceptibles d'intervenir dans la variabilité interindividuelle de réponse à la méthadone et sont de bons candidats pharmacogénétiques pour l'adaptation posologique de ce traitement de substitution aux opiacés [37]. L'analyse combinée de ces multiples polymorphismes génétiques a montré qu'elle permettrait une individualisation plus rapide et plus efficace de ce traitement, mais cette approche pharmacogénomique nécessite encore d'être validée sur de larges cohortes de patients [37].

4.3 Pharmacotoxigénétique des médicaments antidépresseurs

4.3.1. Antidépresseurs tricycliques

Les antidépresseurs tricycliques (ADT) sont des molécules qui présentent un index thérapeutique très étroit, rendant leur utilisation peu aisée. Par ailleurs, ils sont fortement métabolisés au niveau hépatique, notamment par des cytochromes P450. Pour ces deux raisons, les ADT sont de bons candidats aux applications médicales de la pharmacotoxigénétique. L'amitriptyline et la nortriptyline sont métabolisées par plusieurs cytochromes P450. Alors que le CYP2C19 joue un rôle majeur dans la N-déméthylation de ces molécules, le CYP2D6 contribue lui à la *trans*-hydroxylation de leur cycle benzylique [38]. Les polymorphismes génétiques affectant

ces P450 ont pour conséquence de larges variations interindividuelles dans le métabolisme, et donc dans la pharmacocinétique, de ces molécules [39]. Ainsi, et à titre d'exemple, les métaboliseurs limités pour le CYP2C19 présentent un risque de surdosage et un risque accru de survenue d'effets toxiques, lors de l'administration de doses conventionnelles d'amitriptyline. L'adaptation posologique de ces ADT sur la base des génotypes CYP2D6 et CYP2C19, dans le but d'améliorer leur efficacité et leur sécurité d'emploi, fait l'objet de nombreuses recommandations [39, 40]. Cependant, l'utilisation en routine des tests pharmacogénétiques permettant de prédire le statut métabolique des patients avant l'administration d'un médicament de la famille des ADT reste marginale. Ces tests sont en fait parfois, et surtout, utilisés pour expliquer *a posteriori* un échec thérapeutique et/ou des effets indésirables sévères.

Le métabolisme de la doxépine, autre antidépresseur tricyclique, est également sous la dépendance des CYP2D6 et CYP2C19. Le CYP2C19 catalyse la formation de la nordoxépine (ou N-desméthyldoxépine), métabolite qui présente des propriétés pharmacologiques et toxicologiques comparables à celles de la molécule-mère, alors que le CYP2D6 est impliqué dans la formation de la 2-hydroxydoxépine, autre voie métabolique majeure. Lors d'administrations répétées de doxépine ou d'une ingestion massive, les métaboliseurs lents pour le CYP2D6 présentent un risque accru d'accumulation de doxépine et de son métabolite actif, la nordoxépine, et, par conséquent, de toxicité [41]. Un cas d'intoxication fatale à la doxépine a ainsi été rapporté chez un patient présentant un phénotype déficitaire pour le CYP2D6 et un phénotype extensif pour le CYP2C19, tous deux prédits par génotypage [41].

4.3.2. Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

La fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine, la sertraline et le citalopram sont des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), à l'efficacité et aux effets indésirables similaires. Leur métabolisme fait intervenir des cytochromes P450, en particulier le CYP2D6. La fluoxétine est indiquée dans le traitement des épisodes dépressifs majeurs et du trouble obsessionnel compulsif de l'enfant et de l'adulte, ainsi que dans la prise en charge de la boulimie chez l'adulte. En 2000, un cas dramatique de décès attribué à la fluoxétine a été décrit chez un enfant présentant un déficit d'activité pour le CYP2D6 [42]. Cet enfant de 9 ans était traité par méthylphénidate, clonidine et fluoxétine dans le cadre d'un syndrome d'hyperactivité associée à un déficit de l'attention, un trouble obsessionnel compulsif et un syndrome de Gilles de la Tourette. Il a présenté durant 10 mois des symptômes évocateurs d'une intoxication chronique, avec des troubles gastro-intestinaux, associés à une incoordination motrice et une désorientation, et est finalement décédé suite à un état de mal épileptique à l'origine d'un arrêt cardiaque. La cause de la mort a été attribuée à une intoxication par la fluoxétine, étayée par la mise en évidence dans le sang, mais également dans différents tissus, de concentrations de fluoxétine extrêmement élevées, ayant fait suspecter, dans un premier temps, une tentative d'empoisonnement par les parents adoptifs de l'enfant. Les tests pharmaco-

toxicogénétiques *post-mortem* ont montré que l'enfant présentait un phénotype déficitaire pour le CYP2D6, permettant d'expliquer l'intoxication chronique par accumulation progressive de fluoxétine malgré l'administration de doses conventionnelles, ces résultats ayant permis de lever les poursuites judiciaires à l'encontre des parents adoptifs.

4.3.3. Cas particulier du cytochrome CYP2D6

Le cytochrome P450 2D6 ou CYP2D6 est une enzyme impliquée dans le métabolisme de très nombreux médicaments d'usage courant, dont notamment la plupart des antidépresseurs, que ce soient les ADT, mais aussi des inhibiteurs sélectifs (voir ci-dessus) et non sélectifs de la sérotonine, comme la venlafaxine. Le gène codant pour le CYP2D6 est très polymorphe et ce polymorphisme génétique conduit à l'existence de quatre phénotypes métaboliques dans la population générale, à savoir les phénotypes dits ultra-rapides, rapides, intermédiaires et lents. Du fait de son rôle prépondérant dans le métabolisme de nombreux antidépresseurs, la détermination du statut métabolique pour le CYP2D6 des patients candidats à un traitement antidépresseur représenterait un outil de choix en psychopharmacologie pour adapter *a priori* et individuellement la posologie de ces molécules, voire pour adopter une autre stratégie thérapeutique. Cependant, comme déjà mentionnée plus haut, cette détermination préalable du statut métabolique pour le CYP2D6 est rarement utilisée en pratique médicale courante, alors qu'il permettrait parfois d'éviter des situations dramatiques d'échec thérapeutique ou de toxicité sévère. Le cas clinique présenté par Breil *et al.* [43] est à ce titre une illustration pertinente de l'intérêt des tests pharmacogénétiques dans le cadre de la thérapie médicamenteuse antidépressive. Ce cas décrit en effet l'« errance » thérapeutique d'un homme de 60 ans, sans antécédents médicaux psychiatriques, traité pendant plus de 9 mois par une succession de divers antidépresseurs dans le cadre d'une dépression sévère survenue quelques mois après son départ en retraite. Suite à ces échecs thérapeutiques successifs, un génotypage du CYP2D6 a permis d'établir que cet homme présentait un métabolisme ultra-rapide, responsable de sa pharmacorésistance à la paroxétine, la venlafaxine et la clomipramine. La rémission de son état dépressif fut alors rapidement obtenue grâce à la mise en place d'une thérapie, non plus médicamenteuse, mais électroconvulsive.

5. Conclusion

La pharmacogénétique a pour objectif principal le développement de tests simples et peu coûteux permettant d'identifier les individus à risque de présenter des anomalies de réponse aux médicaments. À ce titre, elle se révèle être un outil de choix dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients, en offrant aux cliniciens la possibilité d'adapter les traitements médicamenteux et leur posologie, en fonction du statut génétique des patients. Cette individualisation des traitements médicamenteux permet d'ores et déjà, pour un certain nombre de médicaments d'intérêt thérapeutique majeur, d'améliorer leur efficacité et de diminuer leurs effets indésirables. La pharmacotoxicogénétique a montré également, ces dernières

années, son intérêt potentiel dans le domaine de la toxicologie médicolégale, en permettant de comprendre, voire de résoudre, certains décès d'origine toxique. Grâce aux progrès récents dans la connaissance des conséquences fonctionnelles du polymorphisme du génome humain et dans le développement de technologies performantes et innovantes de génotypage dites à haut et

très haut débit, la prescription médicamenteuse individualisée sur la base de facteurs génétiques est devenue une réalité médicale dont les médecins ne devraient pas ou plus se priver.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients; a meta-analysis of prospective studies. *J Am Med Assoc* 1998;279:1200-1205.
- [2] Pouyanne P, Haramburu F, Imbs J-L, et al., Admissions to hospital caused by adverse drug reactions : cross sectional incidence study. *BMJ* 2000;320:1036.
- [3] EMIR : Effets indésirables des Médicaments : Incidence et Risque, sur les hospitalisations liées à un effet indésirable médicamenteux. Coordination CRPV de Bordeaux. Décembre 2007.(non publiée).
- [4] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013;138(1):103-41.
- [5] Allorge D, Lorient MA. Pharmacogenetics or the promise of a personalized medicine: variability in drug metabolism and transport. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004; 62:499-511.
- [6] Kalow W. Pharmacogenetics in perspective. *Drug Metab Dispos* 2001;29:468-70.
- [7] Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *J Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 1959;12:52-125.
- [8] McHale CM, Zhang L, Hubbard AE, et al., Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. *Mutat Res* 2010;705(3):172-83.
- [9] Sajantila A, Palo JU, Ojanperä I, et al., Pharmacogenetics in medico-legal context. *Forensic Sci Int* 2010;203:44-52.
- [10] Nakamura Y. DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J Hum Genet* 2009;54:1-8.
- [11] Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;38:61-68.
- [12] Streetman DS, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):187-216.
- [13] Hakooz NM. Caffeine metabolic ratios for the in vivo evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, xanthine oxidase and CYP2A6 enzymatic activities. *Curr Drug Metab* 2009; 10:329-38.
- [14] Morlighem JÉ, Harbers M, Traeger-Synodinos J, et al., DNA amplification techniques in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2011;12(6):845-60.
- [15] Meijerman I, Sanderson LM, Smits PH, et al., Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. *Drug Metab Rev* 2007;39:45-60.
- [16] Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene*. 2003;22:7403-13.
- [17] Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987;41:18-25.
- [18] Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, et al., Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut*. 2003;52(1):140-2.
- [19] Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, et al., Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;336:225-9.
- [20] Dervieux T, Medard Y, Baudouin V, et al., Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:793-800.
- [21] Thompson AJ, Newman WG, Elliott RA, et al., The costeffectiveness of a pharmacogenetic test: a trial-based evaluation of TPMT genotyping for azathioprine. *Value Health J. Int. Soc. Pharmacoeconomics Outcomes Res* 2014;17(1):22-33.
- [22] Manchikanti L, Singh A. Therapeutic opioids: a ten-year perspective on the complexities and complications of the escalating use, abuse, and nonmedical use of opioids. *Pain Physician* 2008;11:S63-88.
- [23] Modesto-Lowe V, Brooks D, Petry N. Methadone deaths: risk factors in pain and addicted populations. *J Gen Intern Med* 2010;25 :305-9.
- [24] Somogyi AA, Barratt DT, Collier JK. Pharmacogenetics of opioids. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:429-44.
- [25] Desmeules J, Gascon MP, Dayer P, et al., Impact of environmental and genetic factors on codeine analgesia. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;41:23-6.
- [26] Gasche Y, Daali Y, Fathi M, et al., Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med* 2004;351:2827-31.
- [27] Koren G, Cairns J, Chitayat D, et al., Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet* 2006;368:704.
- [28] Madadi P, Koren G, Cairns J, et al., Safety of codeine during breastfeeding: fatal morphine poisoning in the breastfed neonate of a mother prescribed codeine. *Can Fam Physician* 2007;53:33-5.
- [29] Madadi P, Ross CJ, Hayden MR, et al., Pharmacogenetics of neonatal opioid toxicity following maternal use of codeine during breastfeeding: a case-control study. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85:31-5.
- [30] Stamer UM, Musshoff F, Kobily M, et al., F. Concentrations of tramadol and O-desmethyiltramadol enantiomers in different CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:41-7.
- [31] Stamer UM, Stüber F, Maders T, et al., Respiratory depression with tramadol in a patient with renal impairment and CYP2D6 gene duplication. *Anesth Analg* 2008;107:926-9.
- [32] Daubin C, Quentin C, Goullé JP, et al., Refractory shock and asystole related to tramadol overdose. *Clin Toxicol (Phila)* 2007;45:961-4.
- [33] Elkalioubie A, Allorge D, Robriquet L, et al. Near-fatal tramadol cardiotoxicity in a CYP2D6 ultrarapid metabolizer. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:855-8.
- [34] Levo A, Koski A, Ojanperä I, et al., Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Sci Int* 2003;135:9-15.
- [35] Li Y, Kantelip JP, Gerritsen-van Schieffelen P, et al., Interindividual variability of methadone response: impact of genetic polymorphism. *Mol Diagn Ther* 2008;12:109-24.
- [36] Eap CB, Crettol S, Rougier JS, et al., Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:719-28.
- [37] Somogyi AA, Barratt DT, Ali RL, et al., Pharmacogenomics of methadone maintenance treatment. *Pharmacogenomics* 2014;15(7):1007-27.
- [38] Shimoda K, Someya T, Yokono A, et al., The impact of CYP2C19 and CYP2D6 genotypes on metabolism of amitriptyline in Japanese psychiatric patients. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22:371-8.
- [39] Spina E, de Leon J. Clinical applications of CYP genotyping in psychiatry. *J Neural Transm* 2015;122(1):5-28.
- [40] Hicks JK, Swen JJ, Thorn CF, et al., Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93(5):402-8.
- [41] Koski A, Ojanperä I, Sistonen J, et al., A fatal doxepin poisoning associated with a defective CYP2D6 genotype. *Am J Forensic Med Pathol* 2007;28:259-61.
- [42] Sallee FR, DeVane CL, Ferrell RE. Fluoxetine-related death in a child with cytochrome P-450 2D6 genetic deficiency. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2000;10:27-34.
- [43] Breil F, Verstuyft C, Orostegui L, et al., Non-response to consecutive antidepressant therapy caused by CYP2D6 ultrarapid metabolizer phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11(5):727-8.

Intérêt et applications en toxicologie analytique du couplage UPLC-Spectrométrie de masse haute résolution avec extraction en ligne des échantillons

Élodie Saussereau^a, Laurent Imbert^a

RÉSUMÉ

Les intoxications médicamenteuses ou avec divers toxiques (stupéfiants, produits phytosanitaires...), volontaires ou accidentelles, sont une cause fréquente d'admission dans les établissements hospitaliers, en particulier dans les services d'urgences et de réanimation médicale. La prise en charge de ces patients intoxiqués repose sur l'anamnèse de l'intoxication, la recherche de signes cliniques et la prescription de bilans biologiques et toxicologiques. Le criblage toxicologique est généralement la première étape de toute investigation toxicologique ; il s'agit d'une étape clé qui devrait idéalement permettre l'identification de toute substance d'intérêt toxicologique. Depuis de nombreuses années déjà, la chromatographie et la spectrométrie de masse se sont imposées comme les méthodes analytiques de référence pour le criblage toxicologique. L'amélioration constante de ces technologies permet cependant de faire évoluer leurs usages vers des procédures de plus en plus rapides, sensibles et fiables. Les couplages de systèmes chromatographiques avec des analyseurs haute résolution mesurant la masse exacte (temps de vol ou TOF, Orbitrap) ouvrent de nouveaux champs d'investigation au toxicologue analyste, en particulier les détecteurs hybrides (Q-TOF, Q-Orbitrap) qui permettent d'acquérir des spectres de fragmentation, en sélectionnant un précurseur dans le quadripôle. L'UPLC-Q-TOF constitue un outil analytique puissant permettant, par mesure de la masse exacte des xénobiotiques, de réaliser un screening large en mode « full scan », c'est-à-dire non ciblé, avec une grande sensibilité et précision. En mode MS^E, cette technologie Q-TOF permet, *a posteriori*, de rechercher et caractériser des métabolites en l'absence de molécules de référence. Enfin, le couplage de l'UPLC-Q-TOF avec une extraction en ligne réduit considérablement le temps de préparation des échantillons et apporte de la robustesse au screening toxicologique.

toxicologie analytique, spectrométrie de masse haute résolution, UPLC-Q-TOF, SPE en ligne.

SUMMARY

Interest and contributions of UPLC-High resolution mass spectrometry with online SPE in analytical toxicology

Intoxications involving drugs, licit or not, either voluntary or not, are frequent causes of admission in emergency and intensive care units. Diagnosis is generally performed through the case story, together with clinical signs, biological and toxicological analysis. A toxicological screening is usually the first step in such cases, and should uncover every compound that has a toxicological meaning. Since several years, chromatography and mass spectrometry are the gold standards for toxicological screening, and their evolution has led to the development of faster, more sensitive, and robust techniques. High resolution mass spectrometers (time-of-flight or TOF ; Orbitrap) are powerful tools bringing more possibilities in the field, and more particularly hybrid analyzers (Q-TOF, Q-Orbitrap) that can acquire fragmentation mass spectra. Highly sensitive and precise non-targeted screenings can be recorded with an UPLC-Q-TOF in "full scan" mode, by measuring exact mass of xenobiotics. In MS^E mode, it is possible to look for metabolites or new synthetic drugs in anterior data without standard reference material. Finally, sample processing is shortened and robustness of screenings is improved by coupling on-line extraction to an UPLC-Q-TOF.

analytical toxicology, high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-TOF, online SPE.

^a Laboratoire de pharmaco-toxicologie,
Groupe Hospitalier du Havre
BP 24, 76083 Le Havre Cedex

* correspondance :
elodie.saussereau@ch-havre.fr

1. Introduction

Le criblage toxicologique est généralement la première étape de toute investigation toxicologique, qui peut-être sollicité dans différents contextes :

- pour confirmer le diagnostic d'une intoxication aiguë médicamenteuse ou avec des produits toxiques ou stupéfiants ;
- pour exclure une hypothèse toxique ou poser un diagnostic différentiel d'intoxication ;

- pour évaluer la gravité d'une intoxication ou pour surveiller l'efficacité de la prise en charge médicale;
- pour le suivi des patients en addictologie, dépendants aux médicaments et/ou aux produits stupéfiants;
- en médecine légale, dans le cadre de décès suspects ou d'une suspicion de soumission chimique.

Le screening toxicologique est loin d'être une tâche aisée puisqu'il requiert l'identification d'un nombre illimité de composés dans des matrices plus ou moins complexes, biologiques (sang, urine, cheveux...) ou non (poudres, comprimés, écouvillons...). La recherche des substances consommées par un sujet sans indication préalable peut être difficile et nécessite fréquemment un processus analytique complexe. En effet, il n'existe pas de méthode analytique universelle qui permette la détection et l'identification non ambiguë de toutes les substances d'intérêt toxicologique en une seule analyse. Généralement, un criblage toxicologique, pour être le plus complet possible, consiste en une succession de procédures analytiques, qui peuvent différer par le mode de préparation des échantillons, la méthode séparative appliquée ou le mode de détection, et qui permettent de collecter des preuves concordantes de la consommation d'une ou de plusieurs substances médicamenteuses, toxiques ou stupéfiants. Une recherche la plus large possible de substances exogènes dans des échantillons biologiques requiert l'usage de procédures analytiques variées, qui doivent permettre de séparer les composés d'intérêt des autres substances présentes dans la matrice initiale, de les détecter avec la plus grande sensibilité possible, et enfin de les identifier avec la plus grande certitude possible.

Aux analyses quantitatives ciblées, se sont associées des techniques de recherche large de toxiques, accompagnées ou non de quantification et appelées « criblage toxicologique », « screening toxicologique », « Multi-Target-Screening » (MTS) ou encore « General Unknown Screening » (GUS). Longtemps restées inaccessibles aux situations d'urgences, elles se sont peu à peu développées pour devenir un outil incontournable au sein des laboratoires de toxicologie hospitaliers. La chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-BD) a permis l'essor de ces nouvelles approches. Par la suite, la détection par spectrométrie de masse a connu une croissance exponentielle : les techniques de chromatographie en phase gazeuse (CPG) et en phase liquide (HPLC) couplées à ce type de détection (CPG-SM et HPLC-SM) se sont démocratisées. Le développement dans les années 2000 d'instruments de type UPLC (chromatographie liquide ultra-haute performance) supportant des pressions très importantes (jusqu'à 1 300 bars), et de colonnes remplies de particules de diamètres inférieurs à 2 µm, a permis d'augmenter la résolution chromatographique tout en réduisant le temps d'analyse [1]. Aujourd'hui, les techniques type HPLC ou UPLC couplées à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-SM/SM - UPLC-SM/SM) occupent une place majeure dans l'arsenal des techniques de toxicologie analytique [2-4].

Les outils analytiques actuels de plus en plus sensibles et spécifiques, incluant des bibliothèques de spectres toujours plus fournies, permettent de détecter un nombre très important de molécules de natures différentes

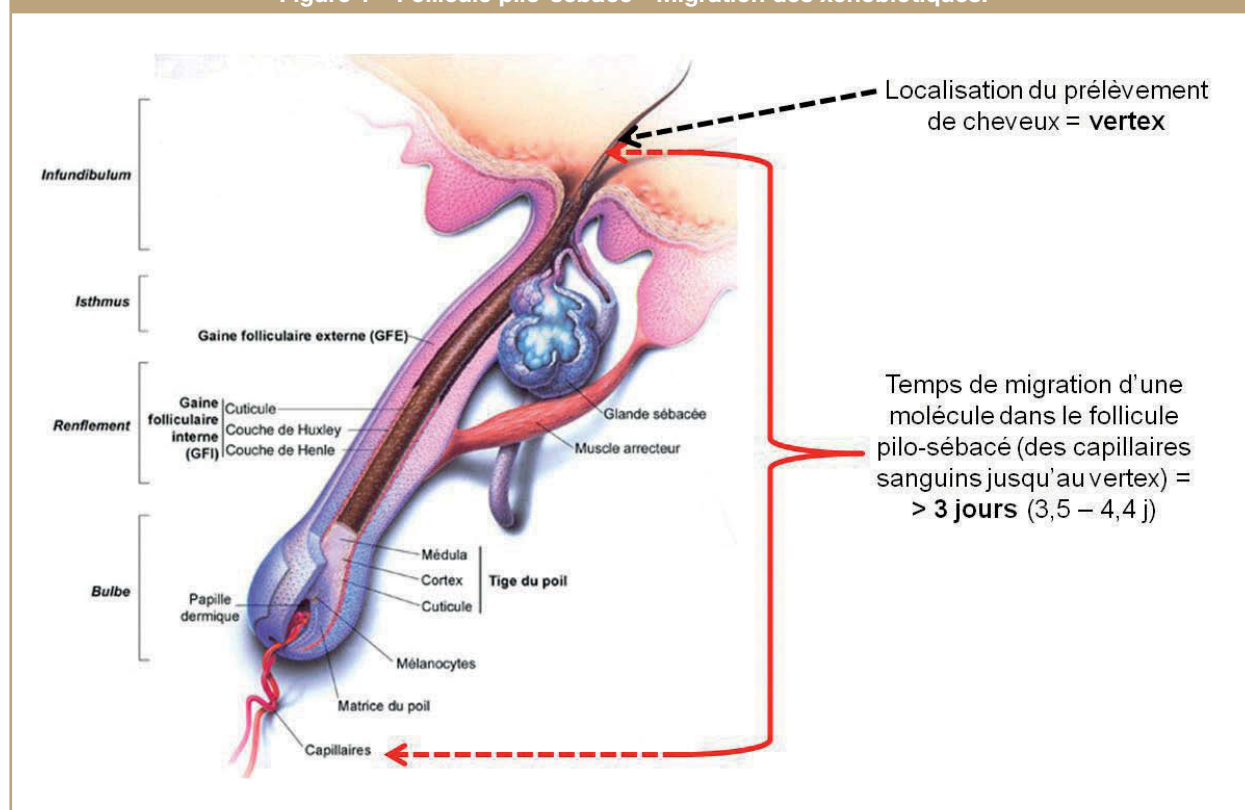
(médicaments, stupéfiants, nouvelles drogues de synthèse, produits phytosanitaires...), à des concentrations toujours plus faibles [5-7]. Un criblage toxicologique peut en théorie être mené sur toute matrice biologique mise à la disposition du laboratoire. Le sang, l'urine et les cheveux sont les matrices classiques de l'analyse toxicologique, mais d'autres prélèvements peuvent être utilisés. Le choix de l'échantillon analysé sera cependant déterminant pour l'interprétation toxicologique des résultats obtenus, puisque ces différentes matrices ouvrent des fenêtres de détection différentes. Il est donc toujours guidé par le contexte de l'investigation.

- **L'urine** concentre la plupart des substances d'intérêt, ainsi que leurs métabolites, et permet de mesurer des concentrations de l'ordre du µg/mL pour certaines substances, ce qui rend leur détection aisée lors de la procédure de criblage. L'urine est une matrice relativement propre, composée à plus de 98 % d'eau, la plupart du temps limpide. L'urine peut ainsi être analysée par chromatographie liquide - spectrométrie de masse après une simple dilution (approche « dilute-and-shoot ») [8]. Un inconvénient majeur de la matrice urinaire est que les résultats d'un criblage toxicologique sont parfois difficiles à interpréter. En effet, certaines substances comme les benzodiazépines par exemple, présentent de nombreux métabolites communs, ce qui rend difficile l'identification de la substance ingérée initialement. D'autre part, la fenêtre de détection étant relativement large dans l'urine (jusqu'à plusieurs jours après la consommation pour certains composés), il est assez délicat, voire hasardeux, de dater une consommation.

À l'inverse, la fenêtre de détection des substances d'intérêt dans le **sang** étant plus courte (jusqu'à quelques heures après la consommation), une analyse toxicologique de cette matrice donnera une indication plus précise de l'état d'intoxication du sujet au moment du prélèvement. D'autre part, le sang étant un vecteur direct des xénobiotiques vers leurs sites d'action, il existe généralement une corrélation entre leur concentration dans le sang et l'effet observé. L'analyse du sang permet également de suivre l'efficacité d'un traitement épurateur par mesures successives du toxique dans cette matrice (toxicocinétique).

- **Les cheveux** sont un milieu extrêmement intéressant en toxicologie, leur analyse permet d'étudier l'exposition à des xénobiotiques plusieurs semaines après leur consommation. La vitesse de pousse des cheveux est en moyenne de 0,34 mm par jour, soit environ 1 cm par mois, avec des variations allant de 0,7 à 1,5 cm/mois [9-10]. Les xénobiotiques présents dans le sang diffusent vers les cellules en croissance du cheveu et sont ainsi incorporés dans la matrice (**figure 1**). Selon la longueur de la mèche de cheveux à analyser, il est possible d'étudier l'exposition aux xénobiotiques pendant plusieurs semaines à plusieurs mois. L'analyse capillaire segmentaire permet de contrôler des variations de consommations ou de contrôler une abstinence sur une période de temps donnée. Les cheveux sont parfois la seule matrice exploitable, notamment lorsque les prélèvements biologiques sont réalisés bien trop longtemps après la prise de substance pour que celle-ci soit encore mesurable dans le sang ou l'urine.

Figure 1 – Follicule pilo-sébacé - Migration des xénobiotiques.



2. La préparation en ligne des échantillons (PEL)

L'extraction-purification des matrices analysées est une étape décisive dans l'identification des xénobiotiques dans le cadre d'un criblage toxicologique. En chromatographie, l'élimination des composants endogènes dus à la matrice est particulièrement importante car ces derniers provoquent une détérioration rapide des performances de la colonne analytique et du détecteur (saturation, augmentation du bruit de fond). Une des limites du couplage à la spectrométrie de masse est sa susceptibilité à l'effet matrice. L'effet matrice va perturber l'analyse qualitative et quantitative et par conséquent risque de compromettre la validité des résultats obtenus. Pour éliminer les composés interférents, plusieurs techniques de préparation d'échantillon sont disponibles : précipitation des protéines endogènes, extraction liquide-liquide (LLE), extraction solide/liquide (SPE), extraction en ligne par chromatographie en flux turbulent. Dans notre laboratoire, la préparation en ligne des échantillons (PEL) est utilisée en routine, couplée à des chaînes analytiques HPLC-SM/SM, depuis de nombreuses années, pour le dosage des médicaments, des stupéfiants ou autres toxiques (cyanures, glycols...) [11-15]. Le couplage de la préparation en ligne (PEL) avec des techniques sensibles et spécifiques comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (par exemple, HPLC-SM/SM, UPLC-Q-TOF), permet de simplifier en amont, la préparation d'échantillons

biologiques complexes [16]. L'objectif de ce couplage est d'automatiser les étapes d'extraction, de concentration et de purification d'échantillons biologiques (sang, plasma, sérum, urine, cheveux...), sans rupture entre la phase préparative et la phase analytique. Les particules de grosse granulométrie (30 - 60 μm) des colonnes de type LPS (« *large particle support* »), autorisent des débits élevés sans générer de fortes pressions. Les protéines et autres substances hydrophiles traversent la colonne alors que les petites molécules sont retenues par interaction hydrophobe. Ce concept est nommé « *turbulent flow chromatography* » (chromatographie en flux turbulent). Les colonnes LPS polymériques de type HLB (copolymère de divinylbenzène-N-vinyl-pyrrolidone), possèdent à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes, d'où une grande polyvalence d'emploi ; ces colonnes n'étant, de plus, absolument pas limitées par une échelle de pH. L'intérêt de la PEL réside dans l'unification des colonnes (extractives et analytiques) et des phases mobiles utilisées. Les échantillons biologiques doivent autant que possible être dilués dans l'eau, les avantages de la dilution étant multiples : dissociation des liaisons protéiques, diminution des effets matrices, amélioration du rapport signal sur bruit et de la résolution des pics chromatographiques. Par sa polyvalence, la PEL est parfaitement adaptée à des analyses pharmaco-toxicologiques en série dans le cadre d'un suivi thérapeutique, ou à des analyses ponctuelles : suspicion d'intoxication aiguë, dosage dans des matrices alternatives comme les cheveux, étude du métabolisme et des variabilités intra- et interindividuelles.

3. La spectrométrie de masse à haute résolution

Depuis maintenant quelques années, les couplages de systèmes chromatographiques avec des analyseurs mesurant la masse exacte ($\Delta m < 5$ ppm) se développent (Temps de vol ou TOF, Orbitrap) offrant de nouveaux champs d'investigation en toxicologie analytique [17-24]. Pour une application de criblage, le seul mode d'acquisition possible pour un instrument de spectrométrie de masse simple est le mode balayage. L'utilisation d'un instrument permettant la mesure de masses exactes comme un TOF ou l'Orbitrap donnera donc un spectre de masse correspondant aux ions pseudo-moléculaires générés dans la source à chaque instant. Cette stratégie est très intéressante, puisque même si l'identification repose sur une base de données, elle permet d'acquérir l'information de manière non ciblée, et laisse donc la possibilité de chercher *a posteriori* des substances inconnues au moment où l'analyse a été faite. Cependant, l'acquisition d'un temps de rétention et d'un seul ion, même avec une très grande précision de mesure, n'est généralement pas suffisante pour acquérir le nombre de points d'identification (IP) nécessaire [25]. Les analyseurs haute résolution (*High Resolution* ou HR) peuvent être couplés à un quadripôle, pour former un instrument hybride de type Q-TOF ou Q-Orbitrap [26-29]. Cette configuration permet d'acquérir des spectres de fragmentation, en sélectionnant un précurseur dans le quadripôle, puis en le fragmentant dans une cellule de collision avant de l'analyser sur le TOF ou l'Orbitrap. Le suivi d'un fragment particulier, ou pseudo-SRM, permet en outre d'effectuer des applications quantitatives. L'application successive d'une basse et d'une haute énergie de collision va permettre d'acquérir à la fois la masse de l'ion parent, et la masse de plusieurs de ses fragments [30-31]. Le traitement des données acquises par un spectromètre de masse HR repose sur le fait qu'un atome a une masse égale à la somme des masses de ses nucléons, moins la masse correspondant à leur énergie de liaison. Cette différence entre la masse des nucléons et la masse de l'atome est nommée défaut de masse («*mass defect*»). La masse d'un atome n'étant alors pas directement proportionnelle à son numéro, il en résulte que chaque assemblage d'atomes aura une masse distincte. La mesure d'une masse exacte permet de calculer, en tenant compte de l'incertitude de mesure, la formule brute du composé détecté, qui peut être confirmée par l'analyse du motif isotopique. Une formule brute pouvant correspondre à plusieurs formules développées, le temps de rétention de l'analyte est indispensable pour pouvoir l'identifier. La détection de fragments permet de conforter l'identification et de distinguer des isomères. Par conséquent, bien que l'acquisition des données soit non ciblée, l'analyse des résultats consiste généralement en une recherche ciblée des substances d'intérêt. De plus, la formule brute d'une nouvelle substance est suffisante pour extraire de façon très sélective un pic chromatographique non détecté initialement. Pour la recherche non ciblée de substances d'intérêt, il existe une seconde approche très intéressante, la filtration des données par leur défaut de masse («*mass defect filtering*»). Le principe repose sur le fait qu'une modification de structure (déméthylation, hydroxylation...) peut entraîner une importante variation de

masse, sans que le défaut de masse ne soit significativement modifié. La filtration des données par leur défaut de masse consiste donc à rechercher toutes les structures présentant un défaut de masse proche (par exemple, ± 50 mDa) de celui d'un composé de base. Si cette approche a un intérêt évident pour la recherche de métabolites, qui permettent de caractériser une consommation, elle est aussi très intéressante pour l'analyse des nouvelles drogues de synthèse [17].

4. Applications du couplage UPLC-QTOF avec PEL

Le couplage des analyseurs hybrides type Q-TOF avec les techniques de chromatographie liquide de type UPLC réduit considérablement le temps d'acquisition et apporte ainsi de la robustesse au criblage toxicologique. Notre laboratoire de pharmacotoxicologie est équipé depuis 3 ans d'une chaîne UPLC-XEVO® G2 Q-TOF (Waters®, Guyancourt, France) avec un système de préparation en ligne des échantillons. La configuration de cette chaîne UPLC-Q-TOF (décrite ci-dessous) en fait un outil analytique « polyvalent » permettant de réaliser des analyses qualitatives ou quantitatives, sur des matrices plus ou moins complexes, biologiques (sang, urine, cheveux,...) ou non (produits stupéfiants par exemple).

4.1. Matériel et méthodes

4.1.1. Préparation des échantillons

Pour le sang et les urines, la prise d'essai est de 50 μ L auxquels sont ajoutés 50 μ L d'une solution d'étalons internes deutérés. Après homogénéisation, 900 μ L d'eau milliQ sont ajoutés. Le mélange est vortexé puis déprotéinisé avec 50 μ L d'acide sulfosalicylique à 5 %. Après centrifugation, 100 μ L de surnageant sont injectés dans le système UPLC-QTOF. Pour les cheveux, 10 mg sont laissés 12 heures à température ambiante dans 200 μ L de tampon Sørensen (pH = 6,8) contenant les étalons deutérés. Après 2 heures aux ultra-sons et centrifugation, 100 μ L de surnageant sont injectés dans le système UPLC-QTOF.

4.1.2. Extraction en ligne et analyse chromatographique

L'extraction-purification en ligne du surnageant s'effectue sur une colonne Oasis HLB (20 x 2,1 mm; 25 μ m, Waters). Le chargement de l'échantillon sur l'Oasis HLB s'effectue à un débit de 2 mL/min pendant 30 secondes avec une solution aqueuse ammoniacale (0,2 % d'ammoniac). Après l'élution des solutés à contre-courant («*back flush*») sur la colonne analytique, l'Oasis HLB est rincée avec un mélange méthanol-eau/acide formique 0,1 % (90-10; v/v). La phase mobile employée est un gradient d'élution d'acétonitrile-acide formique 0,1 % et de formiate d'ammonium 5 mM (pH 3,0). La séparation chromatographique est effectuée en chromatographie liquide ultrahaute performance sur une chaîne analytique ACQUITY® UPLC (Waters®, Guyancourt, France) équipée d'une colonne ACQUITY® HSS C18 150 mm x 2 mm x 1,8 μ m (Waters®, Guyancourt, France) maintenue à 50 °C dans un four thermostaté.

Tableau I – Conditions du gradient analytique UPLC

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	97	3
0,5	97	3
4,2	70	30
9	50	50
9,5	0	100
13,5	0	100
14	97	3

Phase A: tampon formate d'ammonium 5 mM (pH = 3)
Phase B: acétonitrile - acide formique 0,1 %

L'élution de la colonne est faite par un gradient acétonitrile/0,1 % acide formique – tampon formate d'ammonium 5 mM (pH 3,0), à un débit de 0,375 mL/min (**tableau I**). La durée d'un cycle analytique est de 18 min.

4.1.3. Acquisition

Après ionisation en mode électrospray positif, l'acquisition se fait en mode MS^E par un spectromètre de masse hybride quadripôle – temps de vol XEVO® G2 Q-TOF (Waters®). Les principaux réglages sont présentés dans le **tableau II**. Le mode MS^E (l'abréviation « E » faisant référence à l'énergie de collision) effectue une double acquisition permettant de collecter simultanément les informations de masse exacte sur les ions précurseurs et leurs ions fragments : la première fonction (fonction 1) acquiert, à faible énergie de collision, les spectres de masse exacte des ions moléculaires protonés [M + H]⁺ et la seconde (fonction 2) acquiert les spectres de masse exacte des ions fragments produits par l'application d'une rampe d'énergies plus élevées [32-33].

4.2. Screening ciblé dans des matrices biologiques et non biologiques

4.2.1. Sang et urines

L'identification des composés s'effectue par comparaison des temps de rétention et des spectres MS^E par rapport à une bibliothèque contenant plus de 1 000 molécules mères médicamenteuses, stupéfiantes, phytosanitaires..., et leurs métabolites. La solution d'étalons internes utilisée pour ce monitoring ciblé est composée de 26 molécules stupéfiantes deutérées (opiacés, amphétamines, cocaïnes, buprénorphine, méthadone...), permettant, simultanément au criblage,

Tableau II – Paramètres de source et d'acquisition du XEVO® G2 QTOF (Waters®)

Paramètres de source	Paramètres d'acquisition
Ionisation: ESI +	Mode d'acquisition: MS ^E
Tension du capillaire: 0,3 kV	Tension de cône: 20 V
Température de la source: 120 °C	Fonction 1: – Gamme de masse 100 – 1 000 m/z
Débit de cône gaz: 20 L/h	Fonction 2: – Gamme de masse 50 – 1 000 m/z – Rampe de collision: 10 – 40 eV
Température de désolvatation: 550 °C	
Débit de gaz de désolvatation: 800 L/h	

la quantification des substances stupéfiantes identifiées dans le sang et les urines par un calcul du rapport [(surface pic stupéfiant) / (surface pic stupéfiant deutéré)]; calcul effectué *via* le logiciel QuanLynx® (Waters®).

4.2.2. Cheveux

La solution d'étalons internes employée pour ce monitoring ciblé est préparée dans du tampon Sørensen (pH 6,8). Elle est composée des 26 molécules stupéfiantes deutérées utilisées pour l'analyse du sang et des urines, et d'un mélange de substances médicamenteuses psychotropes et de leurs métabolites deutérés (benzodiazépines, zolpidem, ISRS, imipraminiques, neuroleptiques,...), permettant la quantification simultanée de ces substances si elles sont identifiées dans les cheveux, par un calcul du rapport [(surface pic analyte) / (surface pic analyte deutéré)]; calcul effectué *via* le logiciel QuanLynx® (Waters®) (**figure 2**). Dans le cas où les analytes mis en évidence n'ont pas d'équivalents deutérés, un dosage avec une gamme étalon spécifique est réalisé en HPLC-SM/SM. Cette préparation d'échantillon avec le tampon Sørensen contenant un mélange d'analytes deutérés est également applicable aux viscères en toxicologie médico-légale.

Figure 2 – Screening d'une matrice biologique complexe (cheveux) en UPLC-Q-TOF et quantification des médicaments identifiés par rapport à leurs équivalents deutérés.

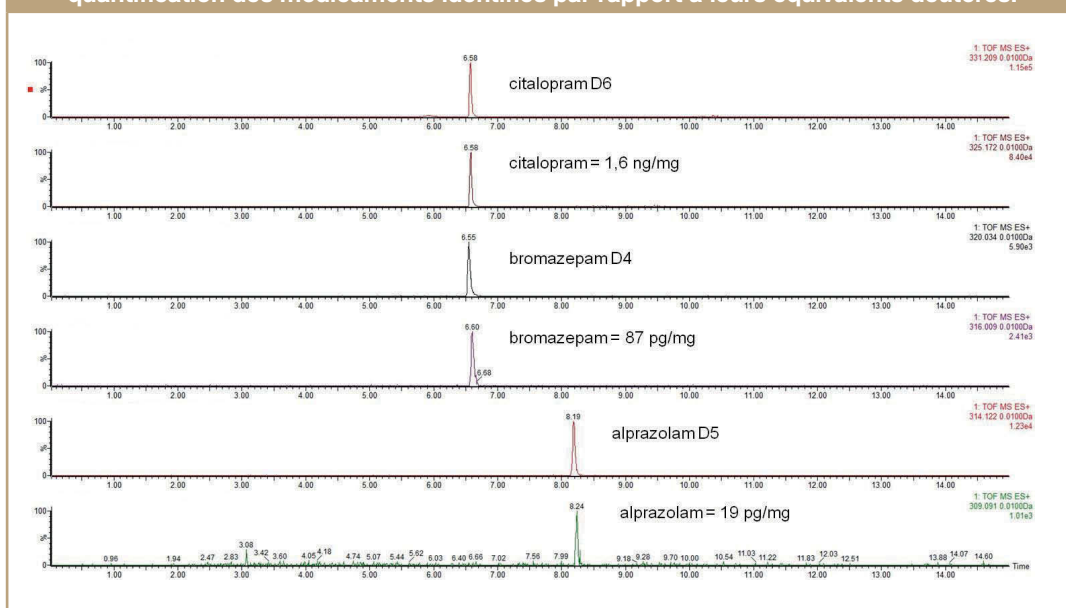
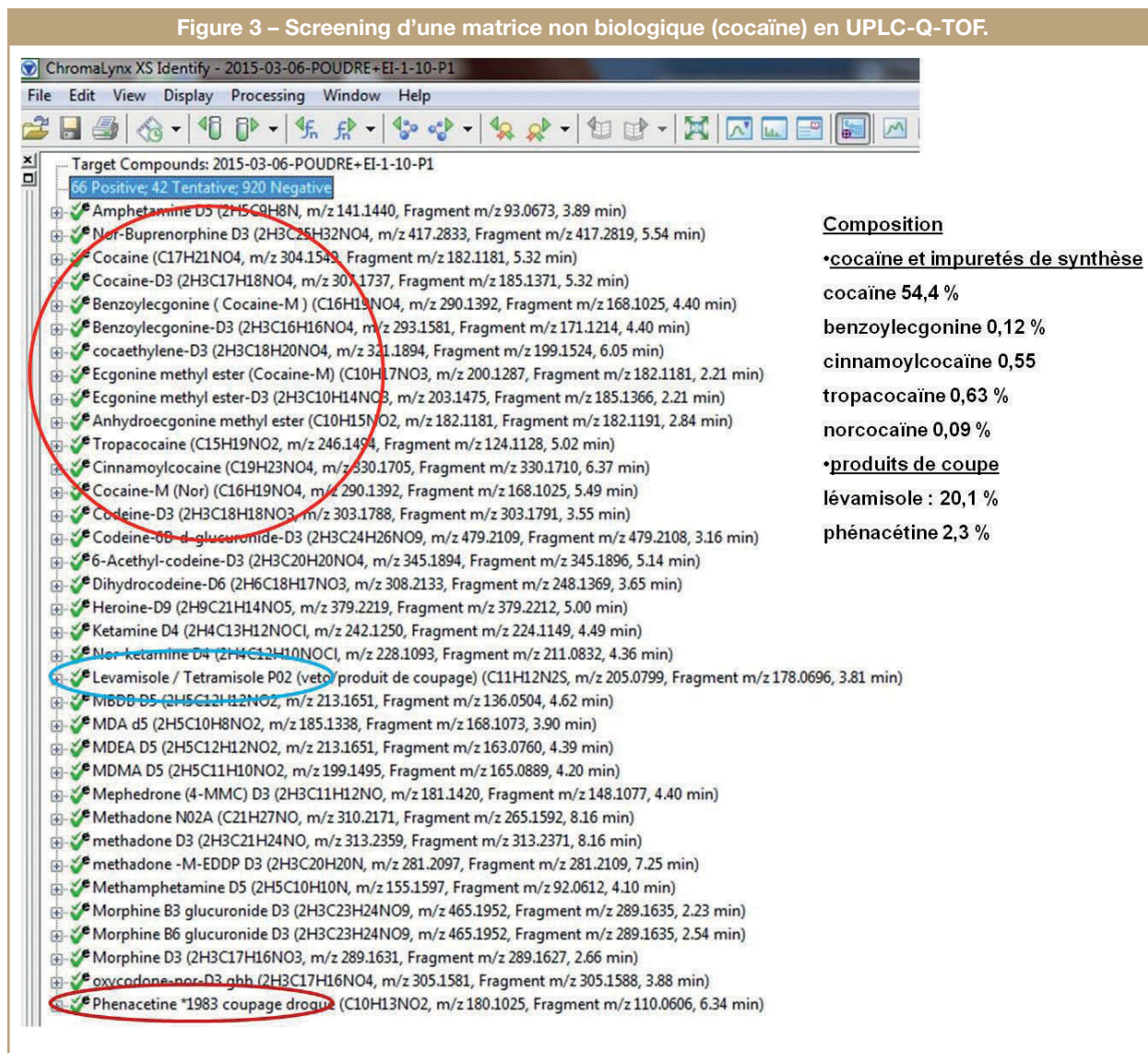


Figure 3 – Screening d'une matrice non biologique (cocaïne) en UPLC-Q-TOF.



4.2.3. Matrices non biologiques

Les plus fréquemment analysées sont des matières premières retrouvées à proximité des victimes d'une intoxication aiguë (overdose) : produits stupéfiants sous forme de poudre (héroïne, cocaïne par exemple) ou de comprimés (ecstasy par exemple). Comme précédemment pour les matrices biologiques, l'utilisation d'un mélange de stupéfiants deutérés permet, simultanément au criblage, de titrer les produits stupéfiants identifiés. D'autre part, la bibliothèque de spectres à notre disposition, permet de caractériser des impuretés de synthèse des drogues (par exemple : noscapine, papavérine, 6-acétylcodeïne, acétylthébaol, pour l'héroïne ; cinnamoylcocaine, tropacocaine pour la cocaïne) et de nombreux produits adjuvants (paracétamol, caféine, lévamisole, phénacétine, benzocaïne, procaine, atropine...) (figure 3). La recherche de métabolites (décrite ci-dessous) a permis d'enrichir cette bibliothèque avec les analytes issus du métabolisme de ces produits de coupe, par exemple, l'hydroxylévamisole-glucuronide. Autres matières premières analysées dans notre labo-

ratoire, des comprimés ou gélules extraits d'un liquide de lavage gastrique (ou du contenu gastrique en toxicologie médico-légale), permettant d'identifier la ou les substances médicamenteuses ou toxiques ingérées par le patient.

4.3. Recherche de métabolites

La recherche systématique des métabolites est réalisée en mode MS^E. Les chromatogrammes et les spectres de masse MS^E sont exploités avec les logiciels de déconvolution MetaboLynx[®] dédié à la recherche de métabolites, et MassFragment[®] pour l'étude des mécanismes de fragmentation (Waters[®]). Le logiciel MetaboLynx[®] répertorie les voies métaboliques connues permettant ainsi, à partir de la formule brute d'une molécule mère, le calcul de la masse exacte des métabolites connus puis de les extraire au sein d'un chromatogramme [32-33]. MetaboLynx[®] présente les masses calculées (théoriques), mesurées, les temps de rétention, les surfaces des pics, les spectres de masses pour chacun des méta-

bolites recherchés. Le spectre moyenné de chaque pic de métabolite suspecté acquis à haute énergie de collision (rampe de 10 à 40 eV) est analysé avec la fonction MassFragment®. Une analyse comparative est faite sur les 20 fragments les plus abondants de chaque spectre de masse. Celle-ci consiste à vérifier, avec les règles de fragmentations connues en spectrométrie de masse, la cohérence des fragments obtenus avec la formule développée de chaque métabolite recherché. En fin d'analyse, pour chaque fragment le logiciel propose une « formule développée » pour le fragment en lien avec la formule développée de ce métabolite, dessinée *via* le logiciel de modélisation moléculaire ChemsSketch® (ACD Labs). Une masse exacte est calculée, un écart de masse inférieur à 3 ppm par rapport à la masse mesurée est considéré comme acceptable. Les principales applications de cette recherche de métabolites dans notre laboratoire sont le diagnostic d'une soumission chimique, la caractérisation des métaboliseurs lents-rapides, la différenciation de xénobiotiques de même masse monoisotopique *via* leurs métabolites respectifs.

4.3.1. Soumission chimique

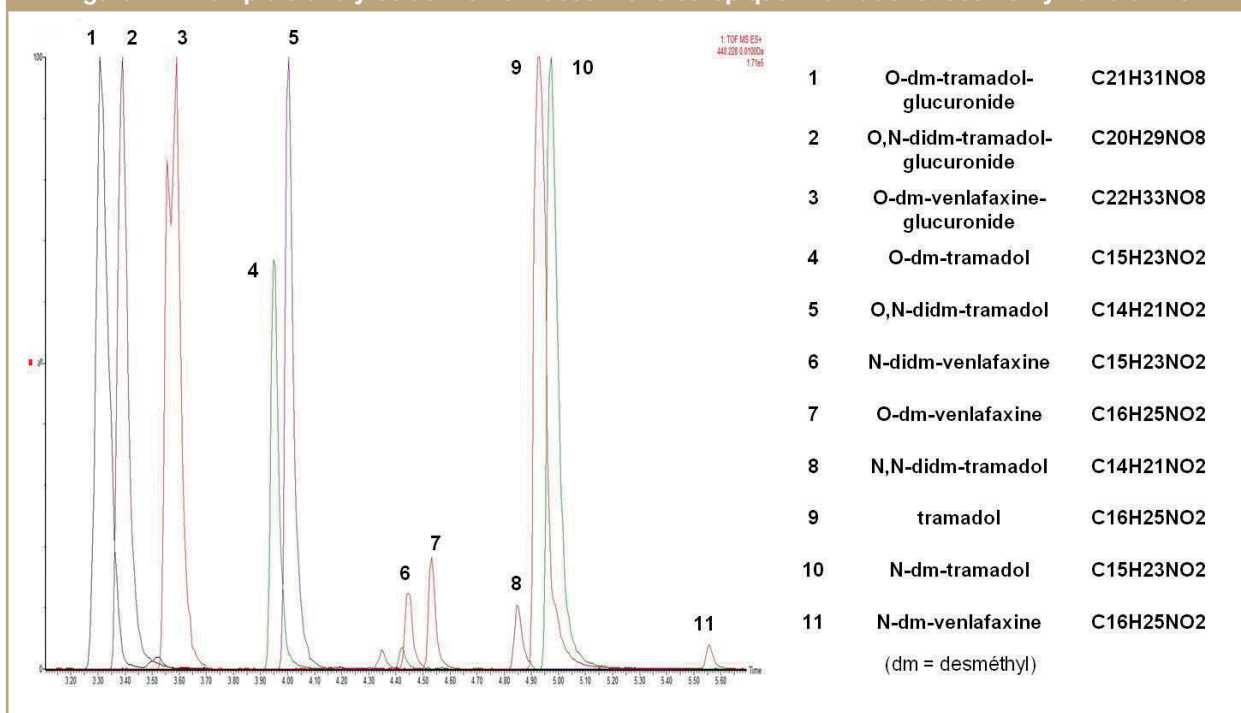
La soumission chimique ou médicamenteuse se définit comme l'administration de substances psychoactives à l'insu de la victime ou sous la menace, à des fins criminelles ou délictuelles. Pour l'agresseur, un produit idéal doit notamment avoir une demi-vie courte, être soluble dans les boissons, agir sur la mémoire de la victime (amnésie antérograde partielle ou totale des faits). Les substances les plus fréquemment identifiées en France sont les benzodiazépines (bromazepam, oxazepam, clonazepam...) et substances apparentées (zolpidem, zopiclone). La victime aura du mal à se rappeler précisément des faits et tardera à porter plainte, retardant ainsi la collecte des prélèvements biologiques hypothéquant fortement la détection du produit. Le métabolisme des xénobiotiques conduit à des composés plus polaires facilitant leur élimination dans les urines. Peu de médicaments sont retrouvés inchangés dans les urines. Pour le toxicologue analyste, la caractérisation de la substance administrée à l'insu de la victime, par l'analyse des prélèvements biologiques est extrêmement difficile compte tenu des propriétés physicochimiques et cinétiques des molécules les plus fréquemment employées (faible quantité, demi-vie courte). La qualité et la précocité des prélèvements biologiques sont déterminantes pour les analyses. En pratique, le toxicologue reçoit souvent du sang et des urines prélevés plusieurs jours, voire une semaine après les faits. L'élargissement de la fenêtre de détection d'un produit dans les urines passe par la caractérisation des métabolites, le plus souvent présents plus longtemps et en beaucoup plus grande quantité. Par exemple, le zolpidem, substance hypnotique, qui a une demi-vie courte ($T_{1/2} = 1,4 - 4,5$ h), est métabolisé en deux principaux métabolites, l'hydroxy-1-phénylzolpidem et l'hydroxy-2-phénylzolpidem. 48 à 67 % de la dose administrée de zolpidem sont éliminés dans les urines sous forme de ces deux métabolites, qui peuvent être détectés pendant plus de 4 jours après une prise unique de cet hypnotique [34]. Les benzodiazépines font partie des psychotropes les

plus fréquemment identifiés dans les cas de soumission chimique, en particulier le bromazepam. Le bromazepam est initialement métabolisé par hydroxylation (3-hydroxy-bromazepam, métabolite actif) et par clivage du cycle diazépine [(2-(2-amino-5-bromo-3-hydroxybenzoyl) pyridine)]. Ces métabolites sont ensuite glucuroconjugés, aboutissant à des substances hydrosolubles éliminées dans les urines. La fraction de bromazepam éliminée dans les urines sous forme inchangée, est négligeable (2 %) par rapport aux dérivés glucuroconjugés du 3-hydroxybromazepam et du 2-(2-amino-5-bromo-3-hydroxybenzoyl) pyridine, qui représentent respectivement 27 % et 40 % de la dose administrée. Après une dose unique de bromazepam, ses métabolites peuvent être détectés pendant au moins 3 jours après l'administration [34].

4.3.2. Polymorphisme des enzymes du métabolisme des médicaments

La vitesse de transformation des xénobiotiques par les cytochromes hépatiques est influencée par des facteurs génétiques. Les cytochromes de la famille 2 tels que les CYP2C9, 2C19 et 2D6 sont sujets à des polymorphismes et ainsi de bons exemples de l'influence de la génétique sur les concentrations et les effets des médicaments. Les mutations peuvent conduire aux phénotypes prédits de métaboliseurs lents ou normaux avec le CYP 2C9, alors que sont identifiés des métaboliseurs lents, intermédiaires, rapides ou ultra-rapides avec le CYP 2D6. Les conséquences pharmacologiques dépendent de la substance impliquée ; par exemple une substance transformée en métabolite inactif verra son effet prolongé par un métaboliseur lent. En cas d'inefficacité thérapeutique ou d'effets indésirables inattendus à des posologies usuelles, des tests génétiques (phénotypage, génotypage) sont disponibles mais non dénués de contraintes. La recherche de métabolites, ou leur absence, par un criblage en masse exacte, se présente comme une alternative intéressante à ces tests génétiques. Par exemple, si le CYP 2D6 est déficient, la codéine n'est pas métabolisée en morphine, il existe alors un risque de toxicité sans l'effet analgésique de la morphine. À l'opposé, les métaboliseurs ultra-rapides subissent des effets marqués avec de très petites doses de codéine. Autre exemple, le nébivolol qui subit un métabolisme intense et est transformé partiellement en métabolites hydroxylés actifs. Le nébivolol est métabolisé par hydroxylation alicyclique et aromatique, N-déalkylation et glucuroconjugaison ; de plus, il se forme des glucuronides avec les métabolites hydroxylés. Le métabolisme du nébivolol par hydroxylation aromatique est soumis au polymorphisme oxydatif génétique dépendant du CYP 2D6. La biodisponibilité orale du nébivolol est en moyenne de 12 % chez les métaboliseurs rapides et est pratiquement totale chez les métaboliseurs lents. À l'état d'équilibre et à la même dose, le pic de concentration plasmatique du nébivolol inchangé est 23 fois environ plus élevé chez les métaboliseurs lents que chez les métaboliseurs rapides. Si l'on prend en considération le médicament inchangé et les métabolites actifs, la différence du pic de concentration plasmatique est de 1,3 à 1,4 fois. Compte tenu de la variation des vitesses

Figure 4 – Exemple d'analytes de même masse monoisotopique: tramadol et desméthylvenlafaxine.



de métabolisme, la dose de nébivolol doit toujours être ajustée aux besoins spécifiques du patient : les métaboliseurs lents peuvent donc avoir besoin de doses moindres. À l'opposé, la rispéridone et son métabolite, la 9-hydroxy-rispéridone ont une activité pharmacologique similaire. Les métaboliseurs rapides du CYP 2D6 métabolisent rapidement la rispéridone en 9-hydroxy-rispéridone, alors que les métaboliseurs lents du CYP 2D6 la métabolisent beaucoup plus lentement. Bien que les métaboliseurs rapides aient des concentrations plus faibles en rispéridone et plus élevées en 9-hydroxy-rispéridone que les métaboliseurs lents, la pharmacocinétique de l'ensemble rispéridone et 9-hydroxy-rispéridone (c'est-à-dire de la fraction antipsychotique active), après administrations uniques et répétées, est similaire chez les métaboliseurs rapides et lents.

4.3.3. Distinction des analytes de masse monoisotopique identique

La spectrométrie de masse exacte est, comme démontré précédemment, un outil analytique puissant, de part sa spécificité et sa sensibilité. Toutefois, il est possible d'être confronté à la présence de xénobiotiques de masse monoisotopique identique et de structure chimique proche compliquant leur séparation chromatographique. C'est le cas du tramadol et de la venlafaxine déméthylée (N-desméthyl et O-desméthyl) de formule brute $C_{16}H_{25}NO_2$ ($m/z = 263,1885$) ; deux substances médicamenteuses fréquemment associées dans les matrices biologiques analysées en toxicologie hospitalière. Il en est de même pour les métabolites déméthylés de ces substances : O-desméthyltramadol, N-desméthyltramadol et N-didéméthylvenlafaxine, de formule brute $C_{15}H_{23}NO_2$ ($m/z = 249,1729$). Afin d'identifier formellement la présence de tramadol et/ou de desméthylvenlafaxine, la caractérisation de métabolites

spécifiques de ces deux substances médicamenteuses a été réalisée via Metabolynx®. Pour le tramadol et la desméthylvenlafaxine, le gradient analytique décrit précédemment, permet de séparer l'ensemble des molécules de même masse monoisotopique (figure 4).

5. Conclusion

Le couplage UPLC-Q-TOF-PEL permet de réaliser des criblages larges de xénobiotiques dans de nombreuses matrices plus ou moins complexes, biologiques (sang, urine, cheveux...) ou non (produits stupéfiants, comprimés non identifiés...), en s'appuyant sur une base de données contenant les informations permettant de les caractériser. Pour les analyseurs haute résolution, cette identification repose sur la connaissance d'une formule brute permettant de calculer la masse exacte de l'analyte, et d'un temps de rétention dans des conditions chromatographiques définies et standardisées. La sensibilité et la spécificité des détecteurs haute résolution sont également potentialisées par un couplage avec un quadripôle (Q-TOF), permettant de générer des fragments spécifiques (mode MS^E). Le mode MS^E permet notamment l'identification, *a posteriori*, de métabolites spécifiques d'un xénobiotique, sans disposer des solutions standards. La caractérisation de ces métabolites permet d'élargir la fenêtre de détection d'un composé ; les métabolites étant présents dans les urines en beaucoup plus grande quantité et y persistant plus longtemps. L'identification d'un ou plusieurs métabolites spécifiques permet aussi de confirmer la présence d'un xénobiotique donné.

Conflits d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Guillaume D, Ruta J, Rudaz S et al., New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal Bioanal Chem* 2010;397(3):1069-82.
- [2] Chousterman B, Payen D, Mégarbane B, et al., Éléments de chromatographie et de spectrométrie de masse à l'usage des cliniciens. *Réanimation* 2010;19(6):593-6.
- [3] Viette V, Fathi M, Rudaz S, et al., Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(7):1091-103.
- [4] Peters FT, Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 2011;44(1):54-65.
- [5] Arnhard K, Gottschall A, Pitterl F, et al., Applying "Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra" (SWATH) for systematic toxicological analysis with liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(2):405-14.
- [6] Broecker S, Herre S, Wüst B, et al., Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(1):101-17.
- [7] Concheiro M, Castaneto M, Kronstrand R, et al., Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching. *J Chromatogr A* 2015;1397:32-42.
- [8] Fitzgerald RL, Griffin TL, Yun YM, et al., Dilute and Shoot: Analysis of Drugs of Abuse Using Selected Reaction Monitoring for Quantification and Full Scan Product Ion Spectra for Identification. *J Anal Toxicol* 2012;36(2):106-11.
- [9] Lebeau M, Montgomery MA, Brewer JD, The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Sci Int* 2011;210(1-3):110-6.
- [10] Pragst F, Balikova MA, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 2006;370(1-2):17-49.
- [11] Lacroix C, Sausseureau E, Goullé JP, Préparation en ligne des échantillons. *Annal Toxicol Anal* 2010;22:89-96.
- [12] Lacroix C, Sausseureau E, Fast liquid chromatography / tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *J Chromatogr B* 2012;905:85-95.
- [13] Sausseureau E, Lacroix C, Gaulier JM, et al., On-line liquid chromatography-tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J Chromatogr B* 2012;885-886:1-7.
- [14] Lacroix C, Sausseureau E, Boulanger F, et al., Online liquid chromatography-tandem mass spectrometry cyanide determination in blood. *J Anal Toxicol* 2011;35(3):143-7.
- [15] Imbert L, Sausseureau E, Lacroix C, Analysis of eight glycols in serum using LC-ESI-MS-MS. *J Anal Toxicol* 2014;38(9):676-80.
- [16] Dalsgaard PW, Rode AJ, Petersen D, et al., Screening of 30 acidic and neutral pharmaceuticals in whole blood by fully automated SPE and UPLC-TOF-MS(E). *Drug Test Anal* 2013;5(4):254-8.
- [17] Roman M, Ström L, Tell H, et al., Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry analysis of postmortem blood samples for targeted toxicological screening. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(12):4107-25.
- [18] Dalsgaard PW, Rasmussen BS, Müller IB, et al., Toxicological screening of basic drugs in whole blood using UPLC-TOF-MS. *Drug Test Anal* 2012;4(5):313-9.
- [19] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al., Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: current possibilities and limitations. *Analyst* 2011;136(9):1898-909.
- [20] Maurer HH, What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening? *J Chromatogr A* 2013;1292:19-24.
- [21] Ojanperä I, Kolmonen M, Pelander A, Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Anal Bioanal Chem* 2012;403(5):1203-20.
- [22] Wu AH, Gerona R, Armenian P, et al., Role of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. *Clin Toxicol* 2012;50(8):733-42.
- [23] Tsybin YO, Fornelli L, Kozhinov AN, et al., High-resolution and tandem mass spectrometry--the indispensable tools of the XXI century. *Chimia* 2011;65(9):641-5.
- [24] Hu Q, Noll RJ, Li H, et al., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 2005;40(4):430-43.
- [25] Rivier L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Analytica Chimica Acta* 2003;492(1-2):69-82.
- [26] Andrews GL, Simons BL, Young JB, et al., Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem* 2011;83(13):5442-6.
- [27] Broecker S, Herre S, Pragst F, General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int* 2012;218(1-3):68-81.
- [28] Hogenboom AC, van Leerdam JA, de Voigt P, Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009;1216(3):510-19.
- [29] Meyer MR, Maurer HH, Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies. *Anal Bioanal Chem* 2012;403(5):1221-31.
- [30] Meyer GM, Wink CS, Zapp J, et al., GC-MS, LC-MS(n), LC-high resolution-MS(n), and NMR studies on the metabolism and toxicological detection of mesembrine and mesembrenone, the main alkaloids of the legal high "Kanna" isolated from *Sceletium tortuosum*. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(3):761-78.
- [31] Lee HK, Ho CS, Lu YP, et al., Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultraperformance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2009(1);649:80-90.
- [32] Humbert L, Richeval C, Analyse toxicologique avec mesure par «masse exacte». Caractérisation de métabolites urinaires par couplage UPLC/Q-TOF: apports et intérêts dans le cadre de la soumission chimique. *Ann Toxicol Anal* 2012;24(2):87-96.
- [33] Lecompte Y, Richeval C, Humbert L, et al., UPLC-ESI-Q-TOF-MS(E) identification of urinary metabolites of the emerging sport nutrition supplement methoxyisoflavone in human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2014;96:127-34.
- [34] Baselt RC, Disposition of toxic drugs and chemicals in man. California, USA:Biomedical Publications;2011:9th Edition.

Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool

Thomas Gicquel^{a,b,c}, Sylvie Lepage^a, Isabelle Morel^{a,b,c}

RÉSUMÉ

L'éthanol est la substance psychoactive la plus consommée en France et pose de réel problème de santé publique. La mise en évidence de sa consommation par des méthodes biologiques peut s'avérer importante aussi bien dans des contextes cliniques que dans des affaires médico-judiciaires. L'éthylglucuronide (EtG) et l'éthylsulfate (EtS) sont des marqueurs directs d'une consommation d'éthanol pouvant être identifiables dans différentes matrices biologiques comme le sang, l'urine ou les cheveux, ce qui représente un intérêt majeur à leur utilisation. De plus, leur détection peut se faire plusieurs heures voire même plusieurs jours après ingestion, ce qui permet de mettre en évidence une consommation d'éthanol après que celui-ci ait disparu de l'organisme. Cet article présente de manière synthétique les voies de production de l'EtG et l'EtS lors du métabolisme de l'éthanol, les méthodes actuellement employées pour leur mise en évidence, ainsi que les précautions d'interprétation des résultats et les applications du dosage de ces marqueurs dans différents contextes.

toxicologie, alcool, éthanol, éthylglucuronide, éthylsulfate.

SUMMARY

Ethylglucuronide and ethylsulfate, biomarkers of ethanol consumption

Ethanol is the most frequently psychoactive substance used in France, leading to major public health problems. Alcohol intake detection might be important in a variety of clinical and forensic settings. Interestingly, ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) are potentially direct markers of alcohol consumption, being detected in various biological samples such as blood, urine or hair. Moreover, since their detection timeframe corresponds to few hours until several days, these two biomarkers can prove ethanol intake even after the complete elimination of alcohol from the body. We describe herein the metabolic pathway of ethanol leading to EtG and EtS production, the currently used methods for their determination, the precautions in data interpretation and clinical applications of the measurement of these two biomarkers of alcohol misuse.

toxicology, alcohol, ethanol, ethylglucuronide, ethylsulfate.

1. Introduction

Bien que la consommation « festive » d'alcool fasse partie intégrante de la culture française, celle-ci pose un problème majeur de santé publique, notamment lors d'une consommation chronique d'éthanol (l'éthylisme) qui entraîne des risques importants pour la santé. En effet, l'éthylisme chronique peut conduire au développement d'une fibrose et cirrhose du foie, à des cancers digestifs et des troubles neuropsychiatriques souvent irréversibles, induisant une mortalité prématurée. Malgré une consommation en baisse depuis plusieurs décennies, l'éthanol reste la substance psychoactive la plus consommée en France. Dans le monde, 2,25 millions de décès (45 000 décès en France) sont attribuables à l'alcool chaque année [1], ce qui en fait la deuxième cause de mortalité de notre pays, après le tabac [2].

Il est reconnu que plus de 70 millions d'individus dans le monde présentent un mésusage de l'alcool [1].

Les quantités d'alcool ingérées et les modes de consommation permettent de distinguer plusieurs populations d'individus. Ainsi, le test AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) développé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), qui tient compte à la fois de la fréquence de consommation au cours des douze derniers mois, du volume absorbé pendant une journée type de consommation et de la fréquence des épisodes d'alcoolisation ponctuelle importante, permet de définir quatre types de buveurs : 1) les abstinentes et buveurs occasionnels sans risque, 2) les buveurs réguliers sans risque, 3) les buveurs festifs, à risque ponctuel et 4) les buveurs nocifs, à risque chronique. Les buveurs « à risque ponctuel » boivent habituellement moins que les recommandations maximales courantes (moins de 30 g ou de 3 doses d'éthanol / jour) mais peuvent parfois boire au cours d'une soirée six verres ou plus (> 60 g d'éthanol), il s'agit de « binge drinking » courant chez les jeunes où une grande quantité d'alcool est prise au cours d'une fenêtre de temps très courte. Les buveurs « à risque chronique », quant à eux, boivent régulièrement plus que les recommandations courantes (> 30 g d'éthanol / jour) ou au moins une fois par semaine, six verres ou plus sur l'ensemble de la journée [3].

Sachant qu'un tiers des décès liés à la prise d'alcool correspond à des accidents, l'aspect médico-légal de la consommation d'éthanol est très important, notamment du point de vue de la conduite automobile. Les délits routiers

a CHU Rennes, Laboratoire de toxicologie biologique et médico-légale
F-35033 Rennes, France.

b Université de Rennes 1
Faculté de pharmacie, F-35043 Rennes, France

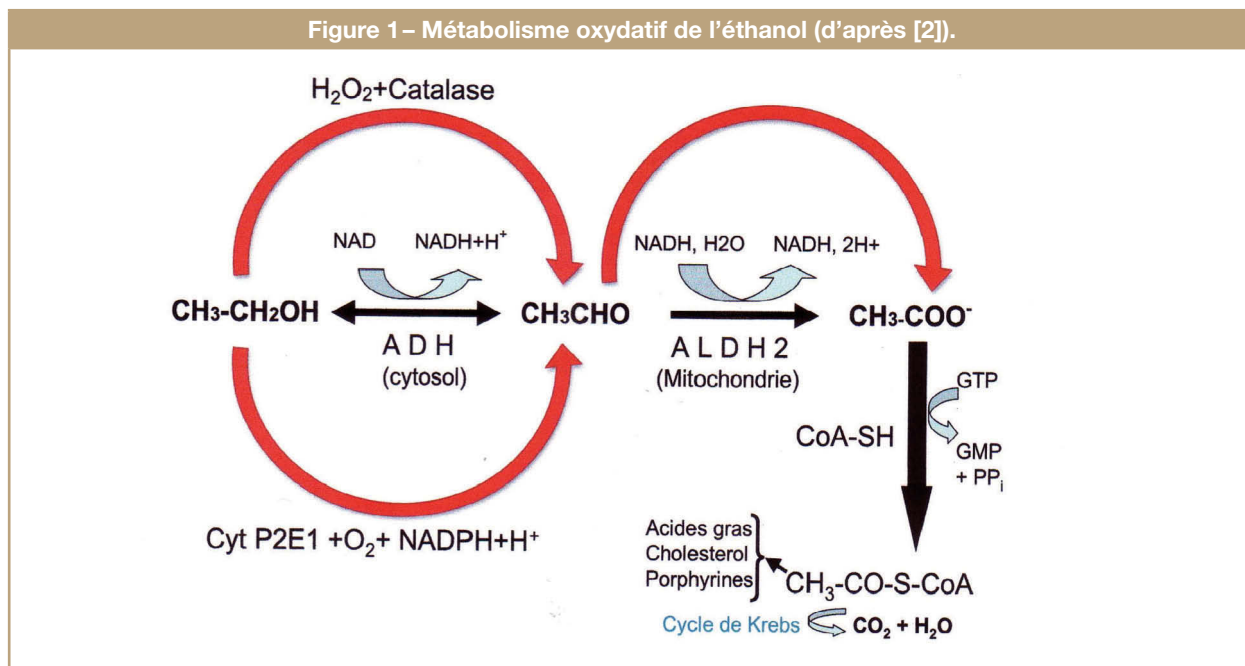
c INSERM, UMR991
« Foie, Métabolismes et Cancer »
F-35043 Rennes, France

* correspondance :
isabelle.morel@chu-rennes.fr

article reçu le 17 août, accepté le 30 septembre 2015

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 1 – Métabolisme oxydatif de l'éthanol (d'après [2]).



sous l'influence de l'alcool sont une préoccupation majeure des forces de l'ordre et la récente modification de la réglementation avec la baisse de la limite légale de l'alcoolémie chez les jeunes conducteurs à 0,20 g/L en est l'illustration. Bien que la mesure de la concentration sanguine d'alcool et celle dans l'air expiré soient les méthodes les plus couramment employées pour déterminer l'imprégnation alcoolique d'un individu, il n'en reste pas moins que l'utilisation d'autres marqueurs de la consommation d'alcool s'avère nécessaire dans d'autres situations, notamment lors du suivi de l'abstinence chez l'alcoolique chronique, comme nous le décrirons ultérieurement dans cet article. Parmi ces marqueurs d'exposition à l'alcool, ceux issus directement du métabolisme de l'éthanol, l'éthylsulfate (EtS) et de l'éthylglucuronide (EtG), présentent des intérêts majeurs que nous allons présenter, en développant leurs avantages et applications ainsi que les limites d'utilisation et les précautions d'interprétation des résultats de leur dosage.

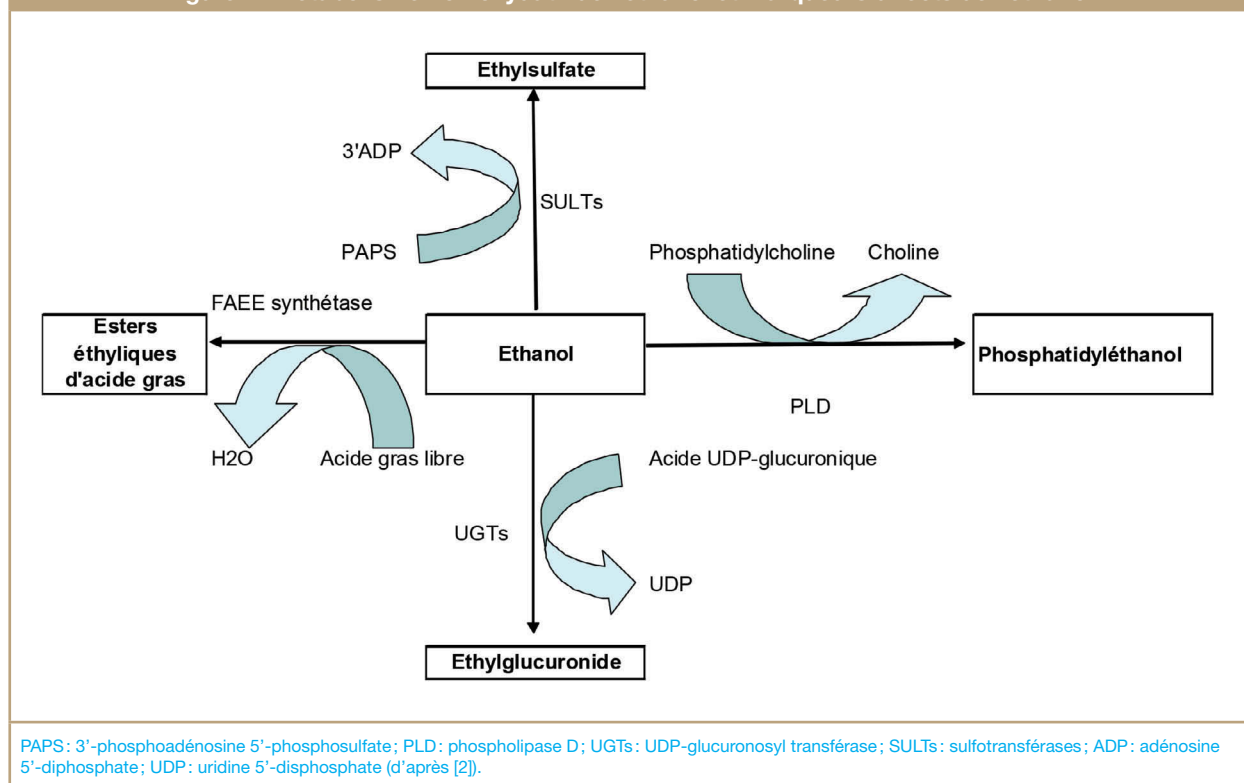
2. Production de l'éthylglucuronide et de l'éthylsulfate lors du métabolisme de l'éthanol

Après ingestion, l'éthanol est absorbé au niveau de l'estomac (environ 10 %) et surtout au niveau du duodénum et du jéjunum proximal (70 à 80 %), c'est-à-dire le début de l'intestin grêle. L'éthanol atteint ensuite le foie par la veine porte puis la circulation générale. Après la prise d'alcool, le pic de concentration sanguine est atteint en moyenne entre 45 à 60 minutes. L'éthanol se distribue rapidement dans tout l'organisme notamment dans les différents compartiments très vascularisés de l'organisme comme le cerveau, les poumons et le foie, où il pénètre par simple diffusion du fait de sa forte liposolubilité au travers des membranes. Le

volume de distribution est en moyenne de 0,5 L/kg chez la femme et de 0,6 L/kg chez l'homme. Une faible proportion d'éthanol est éliminée sous forme inchangée par la sueur, la respiration ou l'urine, mais la majorité de l'éthanol est métabolisée, principalement par oxydation au niveau du foie. Le métabolisme hépatique élimine plus de 80 % de l'alcool ingéré grâce à trois grandes étapes. Dans un premier temps, l'éthanol est oxydé par l'alcool deshydrogénase (ADH) en acétaldéhyde (CH_3CHO), qui est un métabolite hautement toxique dans le cytoplasme de l'hépatocyte. Dans un deuxième temps, l'acétaldéhyde est transformé en acétate (CH_3COO^-) par l'aldéhyde deshydrogénase (ALDH2), essentiellement dans la mitochondrie, puis dans un troisième temps, l'acétate produit dans le foie, est libéré dans la circulation sanguine et enfin lui-même oxydé par les tissus périphériques en dioxyde de carbone (CO_2) et en eau au cours du cycle Krebs (figure 1).

Parallèlement, il existe une autre voie métabolique dite métabolisme non oxydatif de l'éthanol, voie minoritaire aboutissant à la formation d'esters éthyliques d'acides gras (FAEE), de phosphatidyléthanol (PHEt), de l'éthylsulfate (EtS) et de l'éthylglucuronide (EtG). Ces composés correspondent aux marqueurs dits « directs » de l'imprégnation éthylique. L'EtG (éthyl β -D-6-glucuronide) est un métabolite de phase II, qui est issu de la conjugaison de l'éthanol avec un acide glucuronique via les UDP-glucuronyl transférases (UGT) du réticulum endoplasmique de l'hépatocyte (figure 2). Bien qu'elle soit souvent plus faible que la glucuroconjugaison, la sulfoconjugaison est une voie primordiale de détoxification des xénobiotiques par métabolisme de phase II. Ainsi, l'éthanol va être biotransformé par les sulfotransférases (SULTs) cytosoliques en un métabolite sulfoconjugué, l'éthylsulfate (EtS) [4] (figure 2). Les autres marqueurs dits « indirects » dont les variations biologiques peuvent résulter d'une consommation d'alcool sont plus couramment utilisés et correspondent aux enzymes hépatiques (γ -GT et transaminases),

Figure 2: Métabolisme non oxydatif de l'éthanol et marqueurs directs de l'éthanol.



à la transferrine désialylée ou transferrine déficiente en carbohydrates (CDT) et au volume globulaire moyen (VGM). Ceux-ci sont déterminés et exploités dans des conditions de recueil et de stockage d'échantillons standardisées au laboratoire. Ces derniers présentent cependant l'inconvénient de ne pas être exploitables et interprétables dans certaines situations. En effet, ces marqueurs indirects ne sont utilisables que dans le sang de l'individu vivant, ceux-ci n'étant pas interprétables en *post-mortem* [2].

3. Variabilité inter-individuelle de production de l'EtG et l'EtS

L'UDP-glucuronosyl transférase (UGT) et la sulfotransférase (SULTs) sont sujettes à un polymorphisme génétique pouvant influencer le profil de production de l'EtG et de l'EtS selon les individus [4]. De plus, une étude récente a montré que la biotransformation de l'éthanol en EtG par les UGT était sous l'influence des composants nutritionnels [5]. Les différences ethniques, en particulier le déficit enzymatique bien connu chez les Asiatiques, et les différences hommes/femmes sont aussi des facteurs de variabilité du métabolisme de l'éthanol et par conséquent de la production des marqueurs en question. Malgré ces variations, il a été montré que la quantité d'EtS éliminé dans les urines était bien corrélée à celle d'EtG [4], même si le rapport EtG /EtS peut varier d'un individu à l'autre de 0,3 à 6,1 ce qui représente un intervalle de valeurs assez large. Ainsi, les résultats du dosage de ces marqueurs doivent être interprétés avec précaution.

4. Les marqueurs directs de la consommation d'alcool: EtG et EtS

L'EtG et l'EtS représentent moins de 0,5 % de l'alcool éliminé. Ces deux métabolites de phase II sont produits chaque fois qu'un individu ingère, absorbe ou inhale de l'éthanol. Sachant que l'EtG et l'EtS s'accumulent à la suite d'une consommation chronique d'alcool, en cas de consommation importante ou répétée, leur délai de détection est plus long que celui de l'alcool, ce qui représente un intérêt à leur dosage. En effet, en raison d'une élimination plus lente de ces métabolites que celle de l'éthanol, l'EtG et l'EtS sont retrouvés dans les fluides biologiques alors que l'alcool a lui-même disparu de l'organisme, ce qui en fait de bons marqueurs d'une consommation ancienne d'alcool. Les fenêtres de temps permettant de mettre en évidence une consommation d'alcool sont relativement faibles lorsque l'analyse correspond au dosage de l'éthanol. Ainsi, l'alcool peut être détecté jusqu'à 4-6 h dans l'air expiré, 10-12 h dans le sang et 18 à 24 h dans les urines. Ces faibles délais peuvent poser problème dans certaines situations, notamment dans un cadre médico-légal. L'orientation vers d'autres marqueurs d'exposition à l'alcool prend alors tout son intérêt. L'EtG et l'EtS peuvent être détectés dans les fluides biologiques quelques heures après consommation d'alcool et sont encore détectables jusqu'à 80 h après élimination complète de l'éthanol [6-8]. D'autres études ont montré que la fenêtre de détection de l'EtG dans le sang pouvait aller jusqu'à 36 h après l'élimination complète de

l'alcool et jusqu'à 5 jours dans les urines [9-10] et cela de manière dose-dépendante [11]. Ainsi, l'identification simultanée d'EtG et d'EtS dans les urines indique que la personne a consommé de l'alcool [12].

Bien que dépendants de la technique analytique employée, les seuils de positivité couramment retenus dans les urines sont de 0,1 mg/L pour l'EtG et de 0,05 mg/L pour l'EtS. Ceux-ci permettent de détecter la consommation d'un à deux verres (ou unités d'alcool) durant les 24 dernières heures [13]. Pour une application clinique, des cut-offs plus élevés de l'ordre de 0,5 mg/L peuvent être fixés afin de diminuer le risque de résultats faussement positifs [14].

5. Précautions de l'interprétation des résultats: Stabilité, production *in vitro*, faux positifs et faux négatifs

L'EtG et l'EtS sont relativement stables *in vitro* lorsque les échantillons sont stockés réfrigérés [15]. Une fois glucuronconjugués ou sulfoconjugués, ces composés ne sont plus volatils, contrairement à l'éthanol, ainsi il n'existe plus de risque d'évaporation. Cependant, il peut y avoir production d'EtG au cours de la conservation de l'échantillon ou en *post-mortem*, notamment par fermentation. Ainsi chez les diabétiques présentant une glucosurie, la fermentation du sucre du tractus urinaire en présence de *Candida albicans* produit de l'éthanol, conduisant à la possibilité de détecter ses marqueurs dans les urines [16]. Dans d'autres situations, à l'inverse, l'EtG et l'EtS sont sujets à l'hydrolyse bactérienne notamment dans les urines contaminées par *E. coli* ou *Clostridium sordellii* lors d'infections urinaires, ce qui conduit à une diminution de concentration [17-18].

D'une manière générale, la stabilité de l'EtG dépend de la matrice, de la température de conservation (transport et stockage des prélèvements) et de la présence de conservateurs (fluorures). Ainsi, il est recommandé un stockage des échantillons à +4 °C dans des conditions évitant la prolifération bactérienne en présence de conservateurs tels que les fluorures [15], l'acide borique ou la chlorhexidine [19]. Il convient donc d'interpréter les résultats d'EtG et EtS en connaissant le risque de faux positifs ou faux négatifs dus à une contamination par des microorganismes, à la putréfaction ou à la mauvaise conservation de l'échantillon. Sachant au contraire que l'EtS n'est pas sujet aux variations de concentration liées à une production lors de mauvaises conditions de conservation, il convient d'effectuer sa mesure avec celle de l'EtG [17]. En effet, la mesure simultanée de ces 2 paramètres est donc particulièrement importante pour pallier au risque de résultats faussement négatifs ou faussement positifs, issus de la conservation du prélèvement biologique.

Un autre facteur à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats concerne les cas d'insuffisance rénale qui mènent à un défaut d'élimination urinaire de ces métabolites hydrophiles EtG et EtS et par conséquent qui conduisent à des concentrations élevées laissant suspecter une consommation plus récente d'alcool ou plus importante que la réalité [20].

Par ailleurs, il existe un risque de voir apparaître des échantillons positifs ne relevant pas d'une consommation d'alcool, notamment lors de l'utilisation de bain de bouche, de médicaments contenant de l'éthanol ou de solution hydro-alcoolique pour la désinfection des mains. Ceci peut conduire à la production d'une faible teneur d'EtG susceptible d'être retrouvée dans les urines.

6. Les autres matrices biologiques

L'EtG et l'EtS sont principalement dosés dans les urines, le sang total ou le plasma. Certaines études présentent aussi des résultats de dosage dans les « spots » de sang séchés [21]. Le dosage de ces marqueurs directs de consommation d'alcool peut aussi s'effectuer dans d'autres matrices biologiques. En effet, après leur production, ces biomarqueurs peuvent atteindre et s'accumuler dans les phanères comme les cheveux, les poils et les ongles [22 – 23] et permettre ainsi la mise en évidence d'une consommation chronique d'éthanol. Cependant, l'interprétation des résultats s'avère très délicate [24]. Chez le nouveau-né, la détection d'EtG et d'EtS dans le méconium ou les cheveux permet de mettre en évidence une consommation d'éthanol par la mère pendant sa grossesse [25] et l'exposition du fœtus au cours des derniers mois de la grossesse.

Une autre matrice, la salive, peut, elle aussi, être exploitée, sachant qu'une étude a montré que le pic de concentration de l'EtG, dans les conditions expérimentales décrites dans l'article, se situait environ 3,5 h après consommation [26]. Dans un cadre médico-légal, en toxicologie *post-mortem*, d'autres matrices permettent également de mettre en évidence la présence d'EtG, comme par exemple l'humeur vitrée, le liquide céphalorachidien (LCR), la bile, le liquide synovial et les organes tels que le foie, le cœur et le muscle strié squelettique [27]. Le dosage de l'EtG et l'EtS dans la moelle osseuse en complément du dosage de l'éthanol semble prometteur dans le domaine médico-légal [28]. Il a même été reporté un dosage de l'EtG dans une dent afin de démontrer une consommation d'éthanol *ante-mortem* [29]. Bien que l'EtG et l'EtS soient retrouvés dans de nombreuses matrices, la quantification de ces marqueurs d'alcoolisation présente surtout un intérêt dans les urines (rapporté à la créatinine), dans le sang et dans les cheveux, où les concentrations peuvent être plus aisément interprétables sur la base des données de la littérature. Les méthodes de dosage de ces biomarqueurs doivent toutefois être validées dans chacune des matrices utilisées.

7. Méthodes de dosage dans les matrices biologiques

L'EtG et l'EtS peuvent être dosés simultanément dans la plupart des matrices biologiques au moyen de techniques séparatives couplées à une détection par spectrométrie de masse. De nombreuses méthodes de dosages ont été développées au moyen de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) ou par mesure de la masse exacte

(technologie Orbitrap ou Temps de vol/Tof) ou bien encore par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) après dérivation des molécules. Cependant, l'hydrophilie importante de ces composés rend leur extraction complexe et conduit à des rendements d'extraction relativement faibles.

Parallèlement, des méthodes immunoenzymatiques (Ther-mofisher) sont commercialisées pour détecter et effectuer le dosage semi-quantitatif de l'EtG dans les urines [11]. Les concentrations en EtG estimées par immunoessais sont généralement plus faibles que celles obtenues par technique séparative, il existe cependant une très bonne corrélation entre ces deux méthodes [30 - 31]. Ces techniques immuno-enzymatiques présentent l'avantage d'être automatisables, rapides et d'avoir une sensibilité suffisante pour réaliser les dosages en routine avec un seuil de positivité de 0,5 mg/L. Elles ne sont toutefois pas applicables au dosage de l'EtG dans les cheveux ou lorsque la sensibilité doit atteindre un faible seuil de 0,1 mg/L. De plus, cette méthodologie ne réalise pas le dosage simultané de l'EtS ce qui ne permet pas de faire la distinction entre une production réelle d'EtG par métabolisme de l'éthanol présent dans l'organisme, et une génération post-mortem ou *in vitro* d'EtG.

8. Les applications de la recherche et du dosage des marqueurs EtG et EtS

La mise en évidence et quelquefois le dosage de l'EtG et l'EtS peuvent avoir de nombreuses applications aussi bien dans les domaines cliniques que médico-légaux.

Ainsi, grâce au dosage de l'EtG et de l'EtS, le suivi de l'abstinence des patients alcooliques peut être réalisé lors de programmes de sevrage. Une absence d'EtG dans les urines permet d'exclure une consommation récente d'alcool [32]. Le dosage d'EtG dans la salive a également déjà été utilisé lors d'entretiens d'embauche [33]. Avant transplantation hépatique, les receveurs doivent prouver leur abstinence. Cependant, chez ces patients, souvent insuffisants hépatiques, les résultats du dosage des paramètres indirects tels que les transaminases, les γ -GT ou la CDT sont parfois inexploitable. Ainsi, le dosage des marqueurs directs comme l'EtG ou l'EtS peut présenter une grande utilité [12,34].

De même, la consommation d'alcool lors de la grossesse est contre-indiquée car elle peut entraîner des syndromes d'alcoolisation fœtale. Ainsi la mesure d'EtS et d'EtG dans le méconium [35], dans les urines ou les cheveux de la mère pendant la grossesse ou dans ceux du nouveau-né permet de mettre en évidence une consommation d'alcool [36]. Ces dosages peuvent aussi trouver leurs intérêts lors de soumission chimique. Les victimes d'agression sexuelle mettent parfois un certain temps avant de porter plainte, l'éthanol n'est donc plus détectable dans les matrices biologiques. La mise en évidence d'EtG ou d'EtS dans les urines ou le sang permet de prouver une consommation d'éthanol malgré une alcoolémie négative [37], et ainsi d'orienter vers la possibilité d'une soumission chimique de la victime sous l'effet de l'alcool.

Enfin dans certains pays, les conducteurs dont le permis a été retiré pour conduite en état d'ivresse doivent prouver une période d'abstinence afin que leur permis de conduire leur soit restitué. Le dosage de l'EtG et l'EtS dans l'urine et les cheveux trouve ici tout son intérêt [38-39].

Dans le domaine médico-légal, le dosage de ces marqueurs est de plus en plus préconisé. L'EtG est le plus souvent recherché dans l'urine et le sang mais il peut également être mis en évidence en *post-mortem* dans d'autres matrices biologiques que nous avons précédemment décrites.

9. Conclusion

La recherche et le dosage de l'EtG et l'EtS dans les différentes matrices biologiques présentent des intérêts et des applications considérables dans la mesure où ces biomarqueurs permettent de mettre en évidence une consommation d'éthanol, plusieurs heures voire même plusieurs jours après que celui-ci ait disparu de l'organisme, ceci avec une fenêtre de détection quelquefois très longue lorsque le dosage est réalisé dans les cheveux. L'évolution des technologies analytiques vers la détection par spectrométrie de masse permet de nos jours la mise en évidence et la quantification de très faibles concentrations en EtG et en EtS, permettant encore d'élargir la fenêtre de détection de ces marqueurs. Toutefois des précautions quant à l'interprétation des résultats doivent être prises et des seuils de positivité dans les différentes matrices doivent pouvoir être déterminés afin de pouvoir discriminer les différents types de consommateurs d'alcool. Dans ce sens, un consensus de la *Society of Hair Testing* (SoHT) a établi que le seuil de positivité d'une exposition à l'alcool chez les consommateurs à risque se situait à partir de 30 pg d'EtG/mg de cheveux [40].

La commercialisation de kits de dosage de l'EtG dans les urines en fait un marqueur intéressant en routine au laboratoire. Toutefois, des résultats faussement positifs ou négatifs soulignent la difficulté d'interprétation des résultats. Il est préférable de doser plusieurs marqueurs simultanément, comme l'EtG et l'EtS, ce qui n'est réalisé qu'au moyen des méthodes utilisant la spectrométrie de masse.

Ainsi, bien que des études récentes aient permis de faire évoluer les connaissances dans ce domaine, des travaux complémentaires devraient être menés afin de préciser l'influence sur les concentrations de ces marqueurs de facteurs biologiques comme le genre, l'âge et les anomalies du métabolisme. Il serait aussi intéressant de pouvoir étudier les possibilités de corréler les concentrations en EtG et EtS dans les différentes matrices biologiques avec l'importance et la durée d'exposition à l'alcool. D'une manière générale, ces travaux complémentaires pourraient permettre d'affiner les connaissances et d'apporter des éléments d'interprétation des résultats relatifs au dosage de ces biomarqueurs de l'alcool.

Conflits d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Walsham NE, Sherwood RA. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Adv Clin Chem* 2014;67:47-7.
- [2] Morel I, Anger JP. L'alcool éthylique et éthyliisme. Dans: Kintz P, Toxicologie médico-légale, Édition Elsevier, 2012; pp. 279-298.
- [3] Babor TF, Higgins-Biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG. AUDIT: The Alcohol Use Disorders Identification Test, Guidelines for Use in Primary Care, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 2001.
- [4] Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol* 2005;29:270-4.
- [5] Schwab N, Skopp G. Identification and preliminary characterization of UDP-glucuronosyltransferases catalyzing formation of ethyl glucuronide. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2325-32.
- [6] Zimmer H, Schmitt G, Aderjan R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: Comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2002;26:11-6.
- [7] Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide - The direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98:51-61.
- [8] Allen JP, Wurst FM, Thon N et al. Assessing the drinking status of liver transplant patients with alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2013;19:369-76.
- [9] Peterson K. Biomarkers for alcohol use and abuse - A summary. *Alcohol Res Health* 2004;28:30-7.
- [10] Maenhout TM, de Buyzere ML, Delanghe JR. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clin Chim Acta* 2013;415:322-9.
- [11] Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
- [12] Erim Y, Böttcher M, Dahmen U, et al. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 2007;5:757-61.
- [13] Albermann ME, Musshoff F, Doberentz E, et al., Preliminary investigations on ethyl glucuronide and ethyl sulfate cutoffs for detecting alcohol consumption on the basis of an ingestion experiment and on data from withdrawal treatment. *Int J Legal Med* 2012;126:757-64.
- [14] Helander A, Böttcher M, Fehr C, et al., Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 2009;44:55-61.
- [15] Schoegl H, Dresen S, Spaczynski K, et al., Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med* 2006;120:83-8.
- [16] Helander A, Olsson I, Dahl H., Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* 2007;53:1855-7.
- [17] Helander A, Dahl H. Urinary tract infection; a risk for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51:1728-30.
- [18] Baranowski A, Serr A, Thierauf W, et al., In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. *Int J Leg Med* 2008;122:389-93.
- [19] Thierauf, A., Serr A, Halter CC. Influence of preservatives on the stability of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine. *Forensic Sci Int* 2008;182:41-5.
- [20] Høiseth G, Nordal K, Pettersen E, et al., Prolonged urinary detection times of EtG and EtS in patients with decreased renal function. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36: 1148-51.
- [21] Redondo HA, Schroeck A, Kneubuehl B, et al., Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int J Leg Med* 2013;127:769-75.
- [22] Morini L, Colucci M, Ruberto MG, et al., Determination of ethyl glucuronide in nails by liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential new biomarker for chronic alcohol abuse and binge drinking behavior. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402:1865-70.
- [23] Berger L, Fendrich M, Jones J, et al., Ethyl glucuronide in hair and fingernails as a long-term alcohol biomarker. *Addiction* 2014;109:425-431.
- [24] Kintz P, Villain M, Mandel A, et al., Les marqueurs de l'éthyliisme chronique. Focus sur les approches immuno-chimiques. *Ann Toxicol Anal* 2009;21:21-5.
- [25] Cabarcos P, Álvarez I, Tabernero MJ, et al., Determination of direct alcohol markers: a review. *Anal Bioanal Chem* 2015;407: 4907-25.
- [26] Høiseth G, Yttredal B, Karinen R, et al., Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0,5 and 1,0 g/kg doses of ethanol. *J Anal Toxicol* 2010;34:319-24.
- [27] Kugelberg FC, Jones AW., Interpreting results of ethanol analysis in post-mortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int* 2007;165:10-29.
- [28] Cartiser N, Bévalot F, Fanton L, et al., State of the art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review. *Int J Legal Med* 2011;125:181-98.
- [29] Zeren C, Keten A, Çelik S, et al., Demonstration of ethyl glucuronide in dental tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med* 2013;20: 706-10.
- [30] Türfür SC, Vo T, Niehaus N, et al., An evaluation of the DRI-ETG EIA method for the determination of ethyl glucuronide concentrations in clinical and post-mortem urine. *Drug Test Anal* 2013;5:439-45.
- [31] Leickly E, McDonnell MG, Vilardag R, et al., High levels of agreement between clinic-based ethyl glucuronide (EtG) immunoassays and laboratory-based mass spectrometry. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2015;41:246-50.
- [32] Junghanns K, Graf I, Pflüger J, et al., Urinary ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulphate (EtS) assessment: valuable tools to improve verification of abstinence in alcohol-dependent patients during inpatient treatment and at follow-ups. *Addiction* 2009;104:921-6.
- [33] Gjerde H, Christopherson AS, Moan IS, et al., Use of alcohol and drugs by Norwegian employees: a pilot study using questionnaires and analysis of oral fluid. *J Occup Med Toxicol* 2010;5:13-21.
- [34] Staufer K, Andresen H, Vettorazzi E, et al., Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre-liver and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption. *Hepatology* 2011;54:1640-9.
- [35] Pichini S, Morini L, Marchei E, et al., Ethylglucuronide and ethyl-sulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts. *Can J Clin Pharmacol* 2009;16:370-5.
- [36] Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, O et al., Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair - potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* 2010;196:74-7.
- [37] Hegstad S, Helland A, Hagelmann C, et al., EtG/EtS in urine from sexual assault victims determined by UPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 2013;37:227-32.
- [38] Liniger B, Nguyen A, Friedrich-Koch A, et al., Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethylglucuronide in hair versus CDT. *Traffic Inj Prev* 2010;11:123-6.
- [39] Aguis R, Nadulski T, Kahl HG, et al., Ethyl glucuronide in hair - a highly effective test for the monitoring of alcohol consumption. *Forensic Sci Int* 2012;218:10-4.
- [40] Pragst F, Balikova MA., State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 2006 ; 370 : 17-49.

QCM Évaluez-vous !

*Ceci est un questionnaire à choix multiples.
Par conséquent, il est possible que certaines questions
puissent bénéficier de plusieurs réponses possibles.
Dans ce cas, il s'agit de les cocher toutes.*

1 Les patients qui présentent un déficit d'origine génétique en CYP3A4 sont à risque accru de myélotoxicité lors d'un traitement par un médicament thiopurinique (azathioprine, 6-mercaptopurine...):

- ☐ A. oui
- ☐ B. non
- ☐ C. ne sait pas

2 La récente restriction d'utilisation de la codéine avant 12 ans, notamment après amygdalectomie, est liée à un risque accru de toxicité (cocher la (ou les) réponse(s) exacte(s)):

- ☐ A. par défaut de métabolisation de la codéine chez les sujets déficitaires en CYP2D6
- ☐ B. par surdosage en morphine chez les sujets présentant un métabolisme ultra-rapide pour le CYP2D6

3 La nortriptyline est métabolisée en un métabolite inactif, la 10-hydroxynortriptyline, par le CYP2D6. Il existe ainsi un risque accru de surdosage, lors de l'administration de doses conventionnelles chez (cocher la (ou les) réponse(s) exacte(s)):

- ☐ A. les métaboliseurs ultra-rapides
- ☐ B. les métaboliseurs intermédiaires
- ☐ C. les métaboliseurs limités
- ☐ D. aucun de ces phénotypes

4 Test de dépistage urinaire (immunochimique) positif pour le cannabis : exposition passive ?

- ☐ A. pourquoi pas
- ☐ B. extrêmement peu probable
- ☐ C. ne sais pas

5 Les tests de dépistages salivaires (immunochimiques) pour le cannabis sont à privilégier par rapport aux tests urinaires (immunochimiques) en raison de leurs performances plus élevées.

- ☐ A. vrai ☐ B. faux

6 La preuve d'une exposition active à du cannabis est constituée par la présence capillaire de:

- ☐ A. Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC)
- ☐ B. cannabidiol (CBD)
- ☐ C. cannabinol (CBN)
- ☐ D. acide Δ^9 -tétrahydrocannabinolique A (THCA-A)
- ☐ E. acide 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylique (THC-COOH)

7 Le JWH-018 est une nouvelle drogue de synthèse. Correspond-t-elle à ?

- ☐ A. un cannabinoïde synthèse
- ☐ B. une cathinone
- ☐ C. une phénéthylamine

8 Combien de nouvelles substances psychoactives sont actuellement surveillées par le dispositif d'alerte précoce de l'Union Européenne (EWS) ?

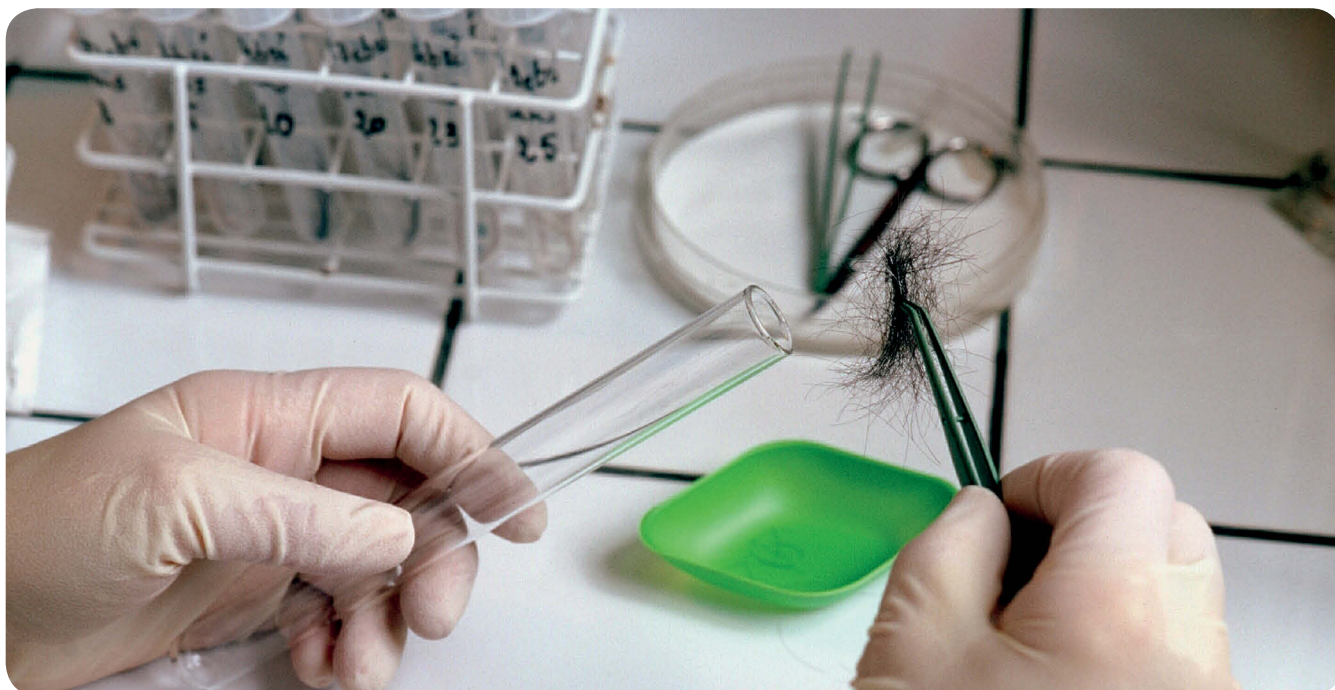
- ☐ A. 100
- ☐ B. 225
- ☐ C. 450

9 La résine de cannabis présente sur le marché en 2015 peut-elle être considérée comme une « nouvelle drogue » ?

- ☐ A. vrai ☐ B. faux

10 Parmi ces paramètres, lesquels correspondent-ils à des marqueurs directs de la consommation d'alcool ?

- ☐ A. EtG
- ☐ B. EtS
- ☐ C. Gamma-GT
- ☐ D. Transaminases (ASAT, ALAT)
- ☐ E. Volume globulaire moyen (VGM)



11 Quelles peuvent être les techniques actuellement utilisées pour rechercher l'EtG dans le sang ?

- ☐ A. la chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)
- ☐ B. la chromatographie liquide couplé à la détection UV - visible
- ☐ C. la chromatographie phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CG-SM)
- ☐ D. la chromatographie phase gazeuse couplé à l'ionisation de flamme
- ☐ E. des méthodes immunoenzymatiques
- ☐ F. des méthodes d'immunofluorescences

12 Quel est le seuil de positivité couramment retenu dans un cadre judiciaire pour l'EtG dans les urines ?

- ☐ A. 0,1 pg/L
- ☐ B. 0,1 ng/L
- ☐ C. 0,1 µg/L
- ☐ D. 0,1 mg/L
- ☐ E. 0,1 g/L

13 Parmi les détecteurs suivants, lesquels sont des spectromètres de masse haute résolution :

- ☐ A. Orbitrap
- ☐ B. spectromètre de masse en tandem
- ☐ C. temps de vol (TOF)

14 Une analyse toxicologique avec un spectromètre de masse haute résolution permet :

- ☐ A. un criblage non ciblé
- ☐ B. un criblage ciblé
- ☐ C. une analyse quantitative

15 Le couplage préparation en ligne des échantillons - UPLC-Q-TOF :

- ☐ A. réduit le temps d'acquisition
- ☐ B. augmente les effets de matrice
- ☐ C. permet l'analyse toxicologique de matrices complexes (par ex. cheveux)

RÉPONSES AUX QUESTIONS

Voir en première page de la rubrique
Entreprise Labo, page 85

Un cas clinique de leucémie primitive à plasmocytes non producteurs d'immunoglobuline

David Fage Phn^a, Katrina A. Rack PhD^b, Charles A. Chevalier Phn^a

1. Observation

M. B., 86 ans, est hospitalisé en gériatrie pour une dégradation de l'état général (anurie, constipation, douleurs à la marche, essoufflement anormal depuis 15 jours sans douleur thoracique associée, sans toux et sans fièvre). Le jour de son admission, l'hémogramme montre des leucocytes (GB) à 19 G/L avec 3 % de cellules lymphoïdes atypiques à l'examen du frottis sanguin. Cette population présente une morphologie hétérogène (*détailée dans la légende de la figure 1*). Elle se compose de lymphocytes réactionnels, de lymphocytes évoquant des plasmocytes, de rares plasmocytes typiques et d'exceptionnelles cellules d'allure plasmoblastique et s'inscrit dans un contexte inflammatoire (CRP à 37,1 mg/L). Une légère hypercalcémie (2,72 mmol/L), une insuffisance rénale (créatinine à 2,7 mg/dL et clairance estimée selon MDRD à 22,54 mL/min/1,73 m²) et une légère augmentation de la LDH (494,5 U/L) sont également constatées. Un CT-scan abdominal révèle une pneumopathie lobaire inférieure droite avec épanchement pleural homolatéral et une déminéralisation osseuse sévère.

Au 2^e jour, l'hémogramme montre des GB à 14,4 G/L dont 7 % de cellules lymphoïdes atypiques et une discrète anémie (12,3 g/dL d'hémoglobine). Malgré une morphologie polymorphe, le caractère dysplasique prédomine : plasmocytes présentant un cytoplasme basophile peu abondant, avec ou sans archoplasme visible, et un noyau, parfois avec un nucléole, à la chromatine plus lâche que celle du plasmocyte, voire très fine, et évoquant des plasmoblastes. Une électrophorèse des protéines sériques est donc réalisée avec effondrement de la fraction gamma. Le dosage spécifique des immunoglobulines montre un taux effondré des différents isotypes et l'immunofixation pentavalente revient négative.

Au 5^e jour, les cellules atypiques représentent 15 % (3 G/L en valeur absolue) des leucocytes (20 G/L). Ce contingent est alors étudié en cytométrie en flux (CMF) à 6 couleurs sur un prélèvement frais de sang périphérique. Il est retrouvé une population (14,9 %) de grande taille en FSC avec le phénotype suivant : CD45-, CD34-, CD117-, CD33+ CD19-, CD7-, CD38+, HLA DR-, CD235a-, CD13-, CD61-, CD36, CD14-, CD138+, CD56- et les chaînes légères Kappa et Lambda intra-cytoplasmiques négatives (*figure 2*). La localisation de la population en SSC/CD45 associée à l'expression du CD38 et 138 et l'absence de marqueur d'autres lignées, hormis le CD33, permet de les identifier en tant que plasmocytes. Il est à noter que l'expression du CD38 est inhabituellement faible. Cependant, l'expression aberrante du CD33 associée à l'absence d'expression des chaînes légères en intracytoplasmique orientent vers une pathologie myélomateuse malgré le contexte de pneumonie et le diagnostic de « leucémie primitive à plasmocytes non producteur d'immunoglobuline » est évoquée. La bêta-2-microglobuline sérique est dosée à 8,87 mg/L. Au 7^e jour, 26,6 % (5,7 G/L) de plasmocytes dysplasiques sont retrouvés en CMF (GB à 21,3 G/L). Une recherche de clonalité plasmocytaire en FISH et en CGH-array est réalisée pour confirmer l'hypothèse diagnostique. La FISH met en évidence une translocation t(11;14) associée à une monosomie 13 et une absence d'hyperdiploïdie des chromosomes 5 et 9. La CGH-array décèle, entre autres, la présence d'une délétion des bras courts d'un chromosome 1 et 12, des remaniements complexes du chromosome 18 (chromothripsis) et deux délétions au niveau des bras courts d'un chromosome 17. Pour l'une de ces délétions 17p, le point de cassure se situe au niveau du gène TP53. Ces anomalies chromosomiques confirment le caractère néoplasique de cette population plasmocytaire. Dans les jours qui suivent, le patient décède suite à la pneumonie à pyocyanique compliquée de choc septique transitoire et de faillite muliparenchymateuse probablement favorisée par une immunodépression secondaire à la pathologie hématologique diagnostiquée.

^a Laboratoire d'hématologie,
CHU de Charleroi, Chaussée de Bruxelles, 140
6042 Charleroi
Belgique

^b Centre de Génétique Humaine
Institut de Pathologie et de Génétique
Avenue Georges Lemaître, 25
6041 Gosselies, Belgique.

* Correspondance
davifage@ulb.ac.be

2. Discussion

2.1. La leucémie à plasmocytes non producteurs d'immunoglobuline

La leucémie à plasmocytes (LCP) représente 2 à 4 % des myélomes multiples (MM). Cette affection se définit par un taux de plasmocytes clonaux circulants supérieur à 20 % et/ou supérieur à 2 G/L. Il existe deux variantes de LCP : la forme primitive (60 à 70 % des LCP), observée *de novo*, et la forme secondaire qui consiste en la transformation leucémique d'un MM diagnostiqué. La LCP primitive

article reçu le 28 juillet 2015, accepté le 12 janvier 2016

© 2015 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Figure 1. Frottis de sang : cytologie des cellules atypiques.

La cytologie révèle le caractère polymorphe de la population. La **figure A** présente au centre un lymphocyte réactionnel (noyau de contour irrégulier et chromatine dense, cytoplasme abondant avec une basophilie de répartition hétérogène et un renforcement de l'intensité en périphérie) et au-dessus, une cellule évoquant un plasmocyte (noyau excentré dans un cytoplasme basophile, peu abondant, de contour irrégulier et avec un archoplasme; cependant, rapport nucléo-cytoplasmique élevé, chromatine plus lâche que celle d'un plasmocyte et laissant parfois apercevoir un petit nucléole). Cet aspect cytologique est également présenté sur les **figures B à F**. La **figure G** visualise un des rares plasmocytes caractéristiques présents (noyau excentré avec chromatine intensément mottée, cytoplasme plutôt abondant, fortement basophile, avec présence d'un appareil de Golgi-zone périnucléaire plus claire et mal délimitée). La **figure H** présente une cellule d'allure plasmoblastique (noyau excentré avec chromatine très fine et un nucléole périphérique; rapport N/C élevé; cytoplasme, peu abondant, basophile et ne révélant pas la présence d'un archoplasme).

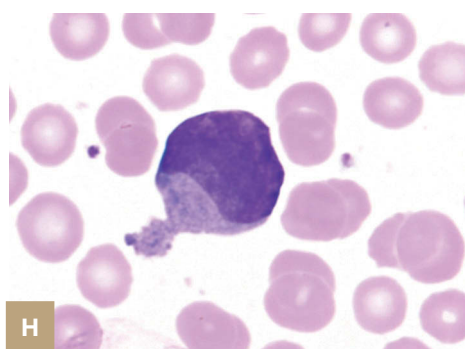
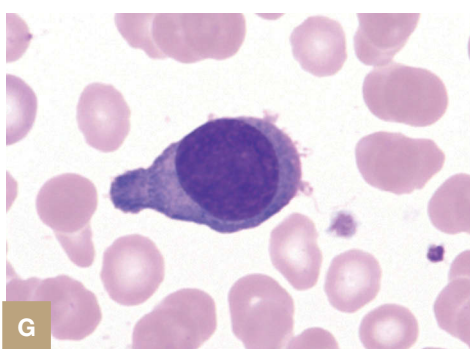
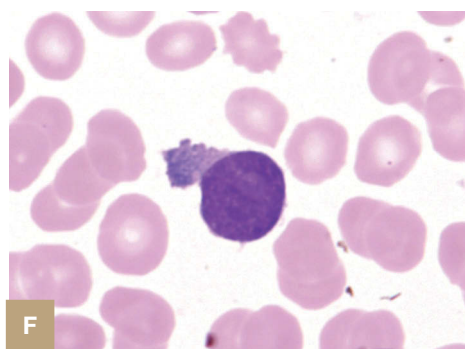
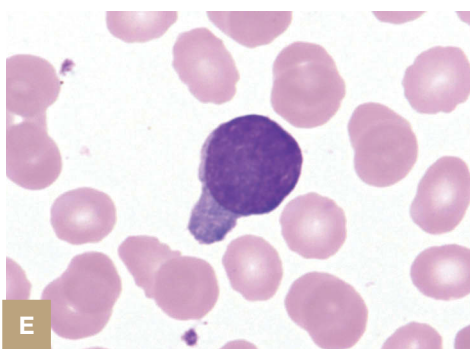
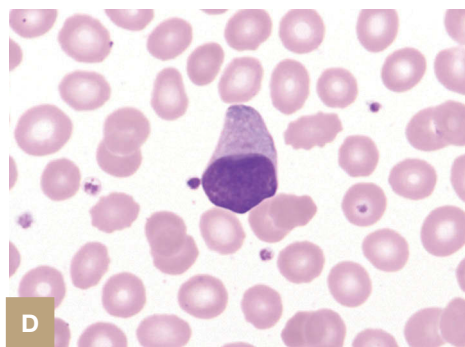
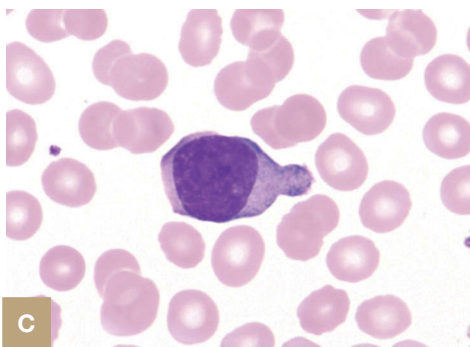
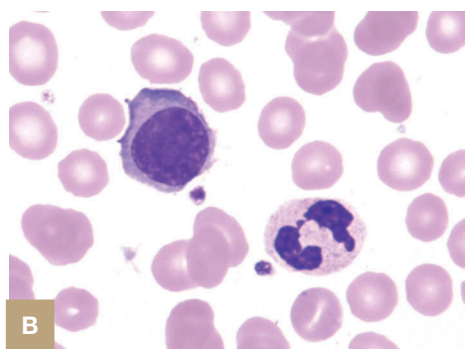
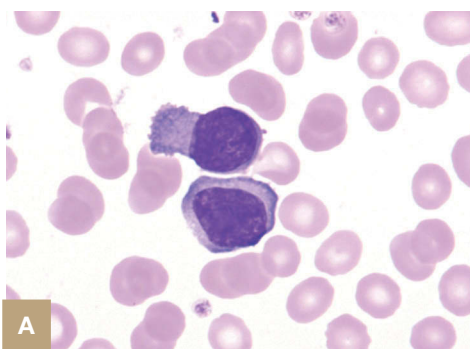


Figure 2. Analyse par cytométrie en flux.

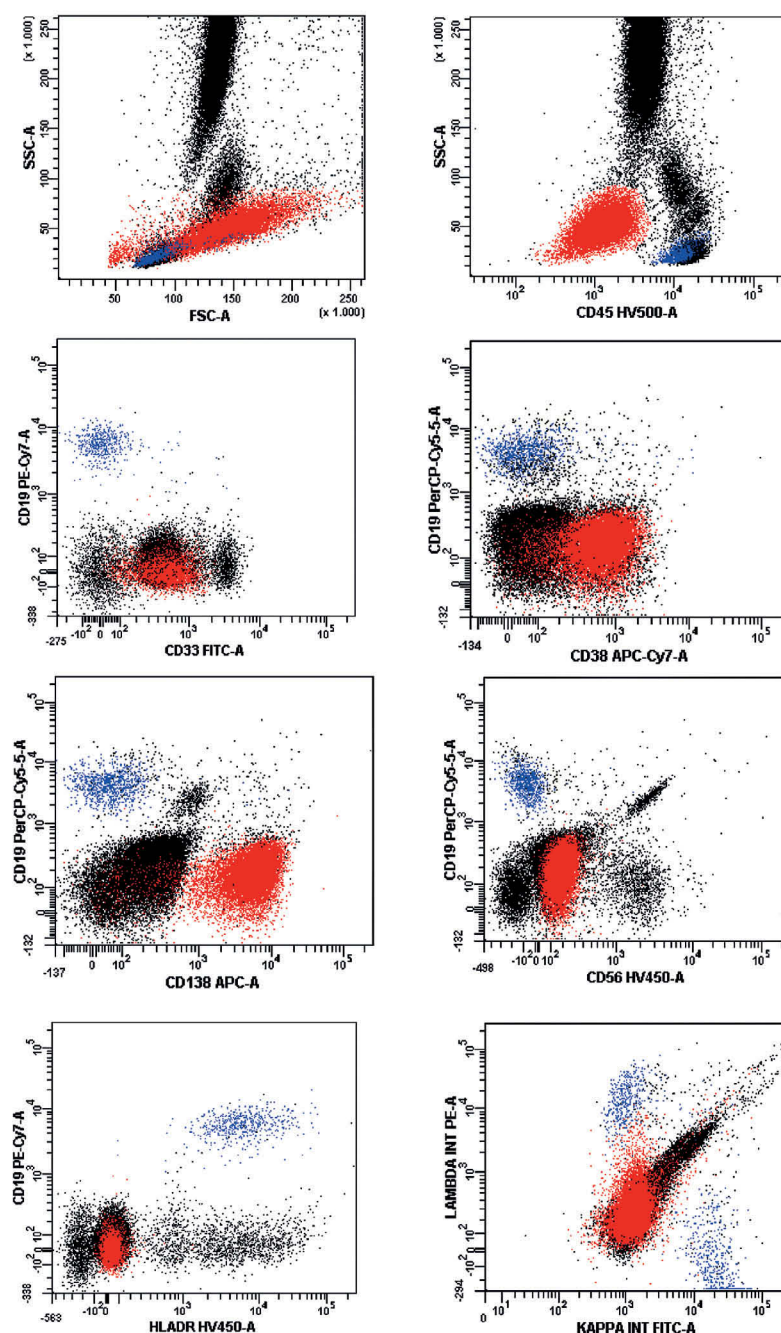
L'analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur BD FACSCANTO™ II.

Le scattergramme SSC/FSC révèle en rouge une population hétérogène en taille (axe FSC) et ayant une faible complexité interne (axe SSC). Son immunophénotype est caractéristique d'une population plasmocytaire: CD45⁻ (seuil de positivité $> 3 \times 10^3$ défini par la région CD45 faible appelée le « triangle des Bermudes »), CD19⁻ (seuil de positivité $> 10^3$ défini par la population lymphocytaire en bleue), CD38⁺ (même intensité d'expression que la population monocyttaire), CD138⁺ (intensité d'expression $> 10^3$).

L'expression du CD 56 est négative (seuil de positivité $> 10^3$ défini par la population de lymphocyte NK). Cette perte d'expression du CD56 est fréquente dans les LCP.

La population plasmocytaire est également HLA-DR⁻ (intensité d'expression $< 10^3$). Elle exprime de manière aberrante le CD33 (même intensité d'expression que la population neutrophile). Le scattergramme lambda/kappa ne montre pas de clonalité mais une absence d'expression des chaînes légères (nuage rouge de distribution centrale homogène et d'intensité d'expression $< 10^4$ en kappa et en lambda).

Au contraire, la population lymphocytaire présente une intensité d'expression et un ratio kappa/lambda dans la normale, témoignant d'un marquage correct des cellules durant le traitement de l'échantillon.



(LCPp) est à rapprocher d'un MM agressif et est de très mauvais pronostic [1].

Une sous-entité encore plus rare est la leucémie à plasmocytes non sécréteurs non producteurs d'Ig. Il s'agit d'un variant caractérisé par une absence de rouleaux érythrocytaires sur le frottis, un effondrement de la fraction gamma des protéines sériques et une absence de bande monoclonale à l'immunofixation associée à une absence de détection d'Ig en intracytoplasmique par CMF et immunohistochimie. Il est à noter que dans la LCP, l'incidence de plasmocytes non producteurs est plus importante (4-17 %) que dans le MM (2 %) [2-5].

2.2. Facteurs pronostiques

Dans ce cas clinique, mise à part la non production d'Ig par les cellules myélomateuses et l'expression aberrante du CD33, le phénotype retrouvé est superposable à celui rencontré dans une leucémie à plasmocyte classique. L'expression du CD33, rarement décrite dans la LCP, est retrouvée dans 18 à 22 % des cas de MM et est un marqueur de mauvais pronostic. Elle est associée à des concentrations de calcémie et de LDH sérique plus importantes et à une allure davantage immature, voire plasmoblastique, des cellules myélomateuses [6].

Les anomalies cytogénétiques associées à la LCP sont similaires à celles identifiées pour le MM (**Tableau I**). Les aberrations chromosomiques sont des marqueurs pronostiques importants pour assigner le patient à un groupe à risque spécifique. Les facteurs de mauvais pronostics incluent la t(4;14), la del(1p21) et plus récemment le chromothripsis (jamais encore décrit dans la LCP et présent dans seulement 1,3 % des MM nouvellement diagnostiqués). Étonnement et contrairement au MM, les del(13q), del(17p) et le gain 1q21 n'influencent pas la survie dans la LCP. La t(11;14) semble être un facteur de bon pronostic [7-10]. Le terme chromothripsis a récemment été utilisé pour décrire un nouveau type de réarrangement chromosomique complexe. Il est la conséquence d'un « événement catastrophique » unique résultant d'une cassure du chromosome durant la mitose [11]. Cette cassure est suivie d'une reconstruction aberrante du chromosome, induisant des réarrangements multiples (translocation, inversion, délétion, duplication, triplication) dans une seule région du génome. Ceux-ci provoquent une dysrégulation d'un nombre élevé de gènes entraînant l'apparition d'un clone d'une haute agressivité pouvant outrepasser le stade de MGUS [10, 12]. Cet « événement catastrophique » est peut-être à l'origine du caractère primitif de la LCP chez le patient.

2.3. Thérapeutique

Dans la LCPp, l'efficacité des thérapies conventionnelles (les agents alkylants comme le melphalan associé à des corticoides; ou les polychimiothérapies telles que l'association vincristine-adriamycine-dexaméthasone [VAD]) sont insatisfaisantes. De nouveaux agents thérapeutiques, des analogues du thalidomide (lenalidomide, pomalidomide) et des inhibiteurs du protéasome (bortezomib, carfilzomib, ixazomib) sont en cours d'investigation pour le traitement cette hémopathie. Le bortezomib est actuellement le médicament le plus prometteur dans la LCPp car il réduit rapidement la masse tumorale et améliore les complications du myélome (IR et hypercalcémie). L'approche la plus prometteuse est la combinaison transplantation de cellules souches

Tableau I. Anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LCP et le MM.

Anomalies cytogénétiques	Incidence dans la LCP	Incidence dans le MM
Monosomie 13	19-85 %	46 %
del(17p)	7-50 %	12 %
t(11;14)	19-71 %	15-21 %
t(4;14)	0-12 %	13 %
t(14;16)	0-2 %	3 %
del(1p21)	33 %	-
ampl(1q21)	51 %	38 %
Non-hyperdiploïdie	12-60 %	51-78 %
Hyperdiploïdie	0-33 %	12-39 %

allo/autologues avec le bortezomib et des immuno-modulateurs [13, 14].

3. Conclusion

Ce cas clinique permet d'insister sur l'importance du rôle de l'hémobiologiste dans l'orientation du diagnostic. Malgré le contexte infectieux expliquant la présence de ces plasmocytes dans le sang du patient, l'atypie morphologique associée à l'augmentation excessive de ce contingent doivent pousser le biologiste à explorer cette population plasmocytaire. Cette démarche du laboratoire, en concertation avec le clinicien, a permis de poser le diagnostic rarissime et très péjoratif de LCPp non productrice d'Ig avec un chromothripsis du chromosome 18. Cette hémopathie clarifiait le caractère agressif de la pneumonie ainsi que certains aspects de la biologie du patient.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nous remercions François Detaye, Olivier Frati et Sébastien Vidrequin pour leur assistance technique et Julien Libert pour l'infographie.

Références

- [1] Jimenez-Zepeda V, Dominguez-Martinez V. Plasma cell leukemia: a highly aggressive monoclonal gammopathy with a very poor prognosis. *Int. J. Hematol.* 2009;89(3):259-268.
- [2] Ma E, Shek T, Ma S-Y. Non-secretory plasma cell myeloma of the true non-producer type. *Br J Haematol.* 2007;138:561.
- [3] Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999;93(3):1032-1037.
- [4] Costello R, Sainty D, Bouadallah R, et al. Primary plasma cell leukemia: a report of 18 cases. *Leukemia Res.* 2001;25(2):103-107.
- [5] Bataille R. Immunopathologie du myélome multiple. *Oncoscopie.* 1999;27-38.
- [6] Shim H, Ha JH, Lee H, et al. Expression of myeloid antigen in neoplastic plasma cells is related to adverse prognosis in patients with multiple myeloma. *Biomed Res Int.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/893243>
- [7] Tiedemann R, Gonzalez-Paz N, Kyle R, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia.* 2008;22(5):1044-1052.
- [8] Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, et al. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in pri-

mary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood.* 2001; 97(3):822-825.

- [9] Chang H, Qi X, Yeung J, et al. Genetic aberrations including chromosome 1 abnormalities and clinical features of plasma cell leukemia. *Leukemia Res.* 2009;33(2):259-262.

- [10] Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi N, et al. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood.* 2011;118(3):675-678.

- [11] Wirk B, Wingard J, Moreb J. Extramedullary disease in plasma cell myeloma: the iceberg phenomenon. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(1):10-18.

- [12] Zehentner B, Hartmann L, Johnson K, et al. Array-based karyotyping in plasma cell neoplasia after plasma cell enrichment increases detection of genomic aberrations. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(4):579-589.

- [13] Fernandez de Larrea C, Kyle R, Durie B, et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia.* 2013;27(4):780-791.

- [14] Van de Donk N, Lokhorst H, Anderson K, et al. How I treat plasma cell leukemia. *Blood.* 2012;120(12):2376-2389.

DESSCRIPTIF

Une jeune fille de 17 ans est adressée aux urgences pour dégradation de l'état général, pyrexie depuis 24 heures (max 39 °C) et dyspnée. Ses antécédents renseignent une infirmité motrice d'origine cérébrale associée à une déficience intellectuelle majeure, une dysmorphie, un retard staturo-pondéral avec difficulté d'alimentation et une épilepsie traitée par Dépakine. Elle est hospitalisée pour infiltration de son orifice de gastrostomie.

Un premier bilan est réalisé et montre une biologie avec un syndrome inflammatoire (CRP à 160 mg/L et leucocytes à 6,31 G/L). Elle est mise sous amoxicilline + acide clavulanique et gavage parentéral. Un second bilan est réalisé 4 jours plus tard (*Tableau I*).

Tableau I - Hémogramme réalisé sur l'automate Sysmex XN-9000®

Paramètres	Résultats 1er bilan	Résultats 2e bilan	Bornes laboratoire
Erythrocytes (T/L)	4,57	5,36	3,8 – 4,8
Hémoglobine (g/dL)	10,9	13,1	12,0 – 15,0
Hématocrite (%)	34,0	57,0	36,0 – 46,0
VGM (fl)	74,4	106,3	83,0 – 101,0
TCMH (pg)	23,9	24,4	27,0 – 32,0
CCMH (g/dL)	32,1	23,0	31,5 – 34,5
Leucocytes (G/L)	6,31	10,7	4,00 – 10,00
Neutrophiles (%)	59,8	71,5	40,0 – 80,0
Lymphocytes (%)	27,3	20,4	20,0 – 40,0
Monocytes (%)	12,4	7,6	2,0 – 10,0
Eosinophiles (%)	0,2	0,1	1,0 – 6,0
Basophiles (%)	0,3	0,4	0,0 – 2,0
Plaquettes (G/L)	153	286	150 – 400
VPM (fl)	10,3	11,7	7,5 – 10,9
Glucose (mg/dL)	378	2100	70 – 110

QUESTIONS

1. Quels sont les paramètres hématologiques dont l'évolution entre les deux bilans attire votre attention ?
2. Comment pouvez-vous expliquer ces évolutions ?
3. Comment feriez-vous pour remettre un résultat correct au clinicien ?

RÉPONSES AU VERSO



a Laboratoire d'hématologie

CHU de Charleroi, Chaussée de Bruxelles, 140,
6042 Charleroi, Belgique.

* Correspondance

davifage@ulb.ac.be

David Fage Phn^a,
Charles A. Chevalier Phn^a

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

RÉPONSES

R1 Les paramètres ayant le plus grand delta non explicable entre les deux prises de sang sont l'hématocrite, le VGM et la CCMH. Cependant, indépendamment du delta entre

les deux résultats, on doit également noter l'incohérence entre les résultats des hématies, de l'hémoglobine et de l'hématocrite.

R2 Ces discordances, touchant l'hématocrite, le VGM et la CCMH, sont provoquées par l'hyperglycémie majeure de la patiente. Le passage du glucose à travers la membrane des érythrocytes se fait par un mécanisme de transport passif. Les érythrocytes sont donc en équilibre avec ce milieu hyperosmolaire. Lors du passage sur un automate d'hématologie, l'échantillon est dilué par un liquide de gainage. Ce réactif est nettement hypotonique par rapport au plasma. Ceci entraîne une entrée d'eau dans les érythrocytes, augmentant leur volume. Ce phénomène induit une

surestimation de l'hématocrite (Ht), qui est le volume total de tous les globules rouges (GR) mesurés par impédance et rapportée au volume d'échantillon analysé. La surestimation de l'hématocrite provoque à son tour une surévaluation du VGM (Ht/GR) et une sous-estimation de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ($CCMH=Hb/Hct$). La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), dépendant de la mesure de l'hémoglobine et de la numération des érythrocytes ($TCMH=Hb/GR$), n'est pas affectée par cette erreur analytique [1-5].

R3 Cette mesure erronée de l'Ht, du VGM et de la CCMH est donc un artefact de laboratoire. L'importance de cette «macrocytose» obtenue in vitro est fonction de la valeur de l'hyperglycémie (figure 1) et de l'automate d'hématologie réalisant l'analyse. En effet, d'autres paramètres que l'hypotonie du diluant sont également à prendre en considération : la valeur de la dilution réalisée par l'automate, l'osmolalité du diluant et le temps d'attente entre la dilution de l'échantillon et l'analyse par l'automate [3]. La valeur de l'hématocrite en micro-tube capillaire est indépendante de la glycémie et prouve que la macrocytose obtenue sur l'automate par impédance est erronée [1, 3]. En revanche, la numération des GR et la mesure de l'hémoglobine ne sont pas influencées par le niveau de la glycémie. La détermination de ces deux paramètres, ainsi que l'obtention de l'hématocrite par sédimentation, permet de recalculer le VGM et le CCMH correctement.

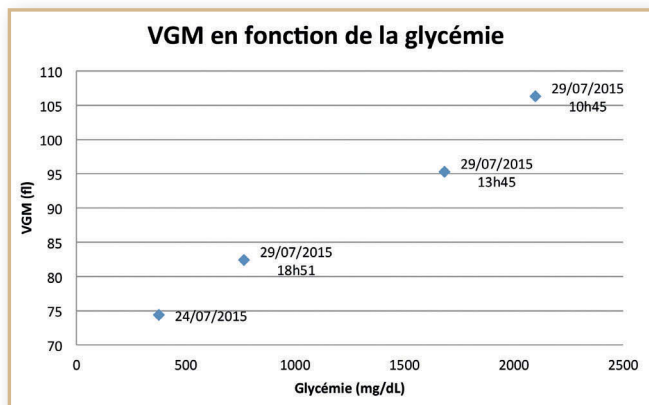


Figure 1 : Impact de la glycémie de notre patiente sur la valeur calculée du VGM. Les résultats ont été obtenus sur l'automate d'hématologie Sysmex XN-9000®.

Bibliographie

- [1] Strauchen JA, Alston W, Anderson J et al., Inaccuracy in automated measurement of hematocrit and corpuscular indices in the presence of severe hyperglycemia. *Blood* 1981;57(6):1065-7.
- [2] Holt JT, DeWandler MJ, Arvan DA, Spurious elevation of the electronically determined mean corpuscular volume and haematocrit caused by hyperglycemia. *Am J Clin Pathol* 1982;77(5):561-7.

- [3] Planas AT, van Voolen GA, Kelly LA, Hyperglycemic macrocytosis in electronically determined mean corpuscular volume. Use of three different automatic cell counters. *Ann Clin Lab Sct* 1985;15(4):286-91.
- [4] Van Duijnhoven HLP, Treskes M. Marked interference of hyperglycemia in measurements of mean (red) cell volume by Technicon H analyzers. *Clin Chem* 1996;42(1):76-80.
- [5] Hosseini H, Dorgalaleh A, Tabibian S et al., Biochemical interfering factors and blood cells indices. *Thrita* 2014;3(1):e15516.

EXERCICE PROFESSIONNEL

Présence physique du biologiste aux heures d'ouverture du laboratoire

En juin 2013, le Cofrac rédige un «**SH REF 04- Rév.01**» appelé «**note de doctrine**» qui définit la présence physique du biologiste aux heures d'ouvertures assez strictement, ce qui suscite un certain mécontentement chez les biologistes.

En novembre 2013, une réunion houleuse a lieu aux JIB sur le sujet.

Le «**SH REF 04- Rév.01**» stipulait :

« Conformément à l'article L.6222-6 du Code de la santé publique, sur chacun des sites, un biologiste médical du laboratoire doit être en mesure de répondre aux besoins du site et, le cas échéant, d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients. Le laboratoire doit comporter un nombre de biologistes au moins égal au nombre de sites qu'il a créés. Le biologiste assumant la responsabilité du site doit être identifiable à tout moment.

Afin d'assurer le respect de cette disposition, conformément au compte rendu des travaux parlementaires, au moins un biologiste médical doit être présent sur chacun des sites du laboratoire en dehors de la période de permanence des soins. **Toutefois, dans l'attente de la publication du décret relatif aux conditions de réalisation des examens de biologie médicale qui viendra préciser les conditions d'exercice des biologistes médicaux**, il appartient à l'équipe d'évaluation, au cours de l'évaluation sur site, d'évaluer la pertinence de l'organisation mise en place par le laboratoire pour la réalisation de ses activités (notamment prestation de conseils, acceptation des demandes d'examen, gestion des urgences et des résultats critiques).

En particulier, elle s'assurera que :

– un biologiste médical assume à tout moment la responsabilité d'un site, et ce pour chacun des sites du laboratoire, et qu'il est identifiable. Un biologiste médical ne peut assurer simultanément la responsabilité de deux sites ;

– au moins autant de biologistes médicaux que de sites du LBM exercent aux heures d'ouverture (par opposition à la période de permanence des soins ou de garde) une activité en relation avec le LBM ;

– si, aux heures d'ouverture, le biologiste médical n'est pas présent sur le site dont il assume la responsabilité, il est disponible et en contact permanent avec le site mais également en mesure d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs et des patients ;

– chaque biologiste médical maintient ses compétences pour l'ensemble des phases de l'examen de biologie médicale, notamment en n'exerçant pas toujours sur un site qui ne réaliserait que certaines phases.

En période de permanence des soins ou de garde, l'équipe d'évaluation s'assurera que le biologiste médical assumant la responsabilité du site est joignable et en mesure d'intervenir, sur place si nécessaire, dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs. »

Au lendemain de ces JIB, Thierry Cote a essayé de rapprocher les points de vue, notamment en suggérant de remplacer la présence physique du biologiste aux heures d'ouverture par une notion de responsabilité/proximité.

Il observe que :

A) La doctrine affirme, en introduction soulignée, que le Législateur a souhaité, dans ses travaux parlementaires, qu'un biologiste soit physiquement présent de l'ouverture à la fermeture d'un site de LBM.

Mais l'expression « heures d'ouverture », présente dans le texte initial, a disparu du texte final.

Les travaux parlementaires, par ailleurs contradictoires, comme il se doit, font état d'un besoin d'affirmer les conditions de la disponibilité des biologistes en accentuant le texte sur le nombre équivalent biologistes/sites plutôt que sur les horaires,



d'où le résultat final par lequel les parlementaires ont remplacé le texte initial (avec les horaires) par le texte final (sans les horaires), contre l'avis du rapporteur et avec une Ministre qui s'en remettait à leur sagesse.

L'affirmation précitée semble donc pour le moins faussement interprétative.

Pour autant, la doctrine ne pose pas la présence physique comme immédiatement opposable.

Car elle indique, après l'affirmation précédente, que, dans l'attente des décrets d'application, elle recommande aux AT d'évaluer la pertinence de l'organisation mise en place, et prévoit le cas suivant : « si, aux heures d'ouverture, le biologiste médical n'est pas présent sur le site dont il assume la responsabilité, il est disponible et en contact permanent avec le site mais également en mesure d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs

RÉPONSES AUX QUESTIONS DU QCM (pages 76-77)

- | | | |
|---------|----------|-------------|
| 1. B | 6. E | 11. A, C, E |
| 2. B | 7. A | 12. D |
| 3. B, C | 8. C | 13. A, C |
| 4. B | 9. A | 14. A, B, C |
| 5. B | 10. A, B | 15. A, C |

de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs et des patients».

Elle affirme plus loin qu'au moins autant de biologistes médicaux que de sites du LBM exercent aux heures d'ouverture. Le vocable «exerce» n'est pas identique à «est présent», conformément, d'ailleurs, au texte d'origine (L.6222-6 ancien).

B) La doctrine affirme qu'un biologiste ne peut pas assurer simultanément la responsabilité de 2 sites.

Elle s'appuie sur deux exigences claires de la rédaction définitive de la loi.

- Le laboratoire doit comporter un nombre de biologistes au moins égal au nombre de sites.

- Le biologiste assumant la responsabilité du site doit être identifiable à tout moment.

Sauf cas particuliers de sites extrêmement proches, il semble raisonnable d'estimer que le croisement de ces 2 exigences ne permet pas à un biologiste de répondre à tous les cas de figure auxquels il pourrait être confronté simultanément sur 2 sites.

L'affirmation précitée semble donc légitime.

En conclusion, Thierry COTE remarque que la note de doctrine postule que la présence physique du biologiste sur le site aux heures d'ouverture est voulue par le législateur, dans ses travaux préparatoires et sera suivie par un décret, mais **elle n'entend pas l'imposer à l'instant de sa rédaction**, ce qui est souhaitable puisque le postulat ne se retrouve pas dans le texte promulgué.

Pour autant, les termes du texte de loi permettent de dire clairement que, **pour répondre aux besoins du site et intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients, il faut, à tout moment (hors PdS) un biologiste identifiable et rapidement disponible par site, sans qu'un même biologiste puisse couvrir 2 sites.**

Ceci suppose que, s'agissant d'un LBMMS donné, **un nombre équivalent de biologistes par rapport au nombre de sites soit présent physiquement sur les 3 territoires de santé infra régionaux chaque jour ouvré, du matin au soir.**

Au total, les biologistes ont raison de dire que la présence physique sur site ne peut pas être opposée à ce jour, mais ils ont tort de dire que le Cofrac entend le faire immédiatement.



Le Cofrac a raison de dire qu'un nombre équivalent de biologistes/site doit être présent sur la zone territoriale, mais il sort de sa mission en anticipant un décret sur la présence physique sur le site du laboratoire.

À ce moment du raisonnement, il n'est pas absurde de penser que la présence physique aux heures d'ouverture, sur site, n'apporte rien de plus à la sécurité des patients, dès lors que la présence physique sur les 3 territoires d'un biologiste par site est opposable et respectée.

Les biologistes d'un groupement doivent pouvoir aller et venir librement entre les sites pour participer à des réunions, des formations internes, faire des prélèvements extérieurs, etc.

Et de fait, dans le SH REF 04, refait en 2014 sous l'appellation «SH REF 04-Rév.02», le mot «doctrine» a disparu, et la présence physique aux heures d'ouverture a été remplacée par la notion de responsabilité/proximité préconisée par Thierry Cote.

- 1- Présence dans les territoires, chaque jour, d'un biologiste par site, pouvant être sur le plateau, en réunion, en formation, etc. et arriver rapidement en cas de besoin.
- 2- Pas de situation où un biologiste serait en responsabilité biologique et physique de 2 sites d'où impossibilité de faire face à une urgence pédiatrique sur les 2 sites à la même heure.

Disons qu'en pratique, c'est-à-dire en évaluation, il est admis qu'un biologiste puisse valider son site et un 2^e site dès

lors que le biologiste responsable du 2^e site est occupé mais présent sur les territoires.

Les exceptions réellement occasionnelles à ces règles sont évaluées au cas par cas et acceptées s'il est prouvé qu'elles sont à la fois exceptionnelles et gérées (délai court pour une urgence).

Le «SH REF 04-Rév.02» devient le texte suivant, opposable actuellement (la partie modifiée est soulignée) :

«Conformément à l'article L.6222-6 du Code de la Santé Publique, sur chacun des sites, un biologiste médical du laboratoire doit être en mesure de répondre aux besoins du site et, le cas échéant, d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients. Le laboratoire doit comporter un nombre de biologistes au moins égal au nombre de sites qu'il a créés. Le biologiste assumant la responsabilité du site doit être identifiable à tout moment.

En conséquence, il appartient à l'équipe d'évaluation, au cours de l'évaluation sur site, d'évaluer la pertinence de l'organisation mise en place par le laboratoire pour la réalisation de ses activités (notamment prestation de conseils, acceptation des demandes d'examen, gestion des urgences et des résultats critiques).

En particulier, elle s'assurera que :

- un biologiste médical assume à tout moment la responsabilité d'un site, et ce pour chacun des sites du laboratoire, et qu'il est identifiable. Un biologiste médical ne peut assurer simultanément la responsabilité de deux sites ;

- au moins autant de biologistes médicaux que de sites du LBM exercent aux heures d'ouverture (par opposition à la période de permanence des soins ou de garde) une activité en relation avec le LBM;
- si, aux heures d'ouverture, le biologiste médical n'est pas présent sur le site dont il assume la responsabilité, il est disponible et en contact permanent avec le site mais également en mesure d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs et des patients;
- chaque biologiste médical maintient ses compétences pour l'ensemble des phases de l'examen de biologie médicale, notamment en n'exerçant pas toujours sur un site qui ne réaliserait que certaines phases.

En période de permanence des soins ou de garde, l'équipe d'évaluation s'assurera que le biologiste médical assumant la responsabilité du site est joignable et en mesure d'intervenir, sur place si nécessaire, dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs. »

Ceci étant, il existe un réel problème dans certaines régions : le recrutement. Certains groupes n'ont pas assez de biologistes, et n'en trouvent pas.

Ce problème masque d'ailleurs un paradoxe :

En théorie les groupes confrontés à ce problème devraient être obligés à moment donné de fermer des sites (écart critique non résolu, d'où fermeture du site ou perte d'accréditation).

Mais ne s'agit-il pas d'un faux problème démographique ? Si les rémunérations proposées étaient plus généreuses, le recrutement ne s'améliorerait-il pas ?

La pression des audits avec le texte actuel n'a-t-elle pas le mérite de pousser les gestionnaires à sortir du paradoxe : mieux payer les biologistes pour éviter de se couper un bras ?

Il est toutefois difficile de mieux rémunérer les biologistes en activité quand on doit équilibrer ses comptes avec des achats de laboratoires qui dépassent les 200 %.

Et il ne faudrait pas non plus que ces problématiques soient résolues par la multiplication des zones de prélèvements dans divers établissements collectifs de soins primaires (CS, MS, etc.) sans biologiste, et sans avoir besoin d'acheter des laboratoires. ■■

DROIT DES SOCIÉTÉS

Modification des conditions et approbation d'une fusion par l'assemblée des actionnaires



© Y. L. Photographies

Un projet de fusion doit être arrêté par les organes d'administration ou de direction (conseil d'administration, directoire, gérants, etc.) de chacune des sociétés participant à l'opération.

Mais la Cour de cassation ne s'était jamais prononcée sur le fait de savoir si les assemblées d'associés de ces sociétés, appelées à se prononcer sur l'opération, avaient un autre choix que d'approuver ou rejeter « en bloc » le projet sans pouvoir le modifier.

C'est chose faite. La Cour de cassation vient de décider* qu'elles pouvaient valablement, sans méconnaître les pouvoirs des organes ayant arrêté le projet, approuver la fusion **après en avoir modifié les conditions**, notamment pour tenir compte des observations du commissaire à la fusion (en l'espèce, modification de la valeur de l'actif apporté à la société absorbante).

Ainsi, *les assemblées d'actionnaires appelées à se prononcer sur un projet de fusion n'excèdent pas leurs pouvoirs en approuvant l'opération après avoir*

modifié le projet arrêté par l'organe de direction.

Cette solution est fondée sur le pouvoir souverain dont dispose l'assemblée pour rectifier les projets qui lui sont soumis. En l'espèce, les actionnaires minoritaires de la société absorbée qui demandaient l'annulation des décisions d'associés approuvant la fusion faisaient aussi valoir que la valeur de l'actif apporté à la société absorbante ne pouvait pas être valablement modifiée par ces décisions car la question de la modification n'avait pas été inscrite à l'ordre du jour. La Cour de cassation a écarté l'argument : l'ordre du jour de l'assemblée était relatif à « l'approbation du projet de fusion prévoyant la transmission universelle du patrimoine » de la société absorbée ; l'assemblée n'était donc pas sortie des limites de l'ordre du jour en décidant d'approuver l'opération après avoir modifié la valeur de l'actif net apporté. En statuant ainsi, la Cour de cassation considère que la modification litigieuse se rattache directement à la question de l'approbation du projet. ■■

* Cass. com. 6 octobre 2015 n° 14-11.680, A. c/ Sté Habitation moderne.

- au moins autant de biologistes médicaux que de sites du LBM exercent aux heures d'ouverture (par opposition à la période de permanence des soins ou de garde) une activité en relation avec le LBM;
- si, aux heures d'ouverture, le biologiste médical n'est pas présent sur le site dont il assume la responsabilité, il est disponible et en contact permanent avec le site mais également en mesure d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs et des patients;
- chaque biologiste médical maintient ses compétences pour l'ensemble des phases de l'examen de biologie médicale, notamment en n'exerçant pas toujours sur un site qui ne réaliserait que certaines phases.

En période de permanence des soins ou de garde, l'équipe d'évaluation s'assurera que le biologiste médical assumant la responsabilité du site est joignable et en mesure d'intervenir, sur place si nécessaire, dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients et les demandes d'information des prescripteurs. »

Ceci étant, il existe un réel problème dans certaines régions : le recrutement. Certains groupes n'ont pas assez de biologistes, et n'en trouvent pas.

Ce problème masque d'ailleurs un paradoxe :

En théorie les groupes confrontés à ce problème devraient être obligés à moment donné de fermer des sites (écart critique non résolu, d'où fermeture du site ou perte d'accréditation).

Mais ne s'agit-il pas d'un faux problème démographique ? Si les rémunérations proposées étaient plus généreuses, le recrutement ne s'améliorerait-il pas ?

La pression des audits avec le texte actuel n'a-t-elle pas le mérite de pousser les gestionnaires à sortir du paradoxe : mieux payer les biologistes pour éviter de se couper un bras ?

Il est toutefois difficile de mieux rémunérer les biologistes en activité quand on doit équilibrer ses comptes avec des achats de laboratoires qui dépassent les 200 %.

Et il ne faudrait pas non plus que ces problématiques soient résolues par la multiplication des zones de prélèvements dans divers établissements collectifs de soins primaires (CS, MS, etc.) sans biologiste, et sans avoir besoin d'acheter des laboratoires. ■■

DROIT DES SOCIÉTÉS

Modification des conditions et approbation d'une fusion par l'assemblée des actionnaires



© Y. L. Photographies

Un projet de fusion doit être arrêté par les organes d'administration ou de direction (conseil d'administration, directoire, gérants, etc.) de chacune des sociétés participant à l'opération.

Mais la Cour de cassation ne s'était jamais prononcée sur le fait de savoir si les assemblées d'associés de ces sociétés, appelées à se prononcer sur l'opération, avaient un autre choix que d'approuver ou rejeter « en bloc » le projet sans pouvoir le modifier.

C'est chose faite. La Cour de cassation vient de décider* qu'elles pouvaient valablement, sans méconnaître les pouvoirs des organes ayant arrêté le projet, approuver la fusion **après en avoir modifié les conditions**, notamment pour tenir compte des observations du commissaire à la fusion (en l'espèce, modification de la valeur de l'actif apporté à la société absorbante).

Ainsi, *les assemblées d'actionnaires appelées à se prononcer sur un projet de fusion n'excèdent pas leurs pouvoirs en approuvant l'opération après avoir*

modifié le projet arrêté par l'organe de direction.

Cette solution est fondée sur le pouvoir souverain dont dispose l'assemblée pour rectifier les projets qui lui sont soumis. En l'espèce, les actionnaires minoritaires de la société absorbée qui demandaient l'annulation des décisions d'associés approuvant la fusion faisaient aussi valoir que la valeur de l'actif apporté à la société absorbante ne pouvait pas être valablement modifiée par ces décisions car la question de la modification n'avait pas été inscrite à l'ordre du jour. La Cour de cassation a écarté l'argument : l'ordre du jour de l'assemblée était relatif à « l'approbation du projet de fusion prévoyant la transmission universelle du patrimoine » de la société absorbée ; l'assemblée n'était donc pas sortie des limites de l'ordre du jour en décidant d'approuver l'opération après avoir modifié la valeur de l'actif net apporté. En statuant ainsi, la Cour de cassation considère que la modification litigieuse se rattache directement à la question de l'approbation du projet. ■■

* Cass. com. 6 octobre 2015 n° 14-11.680, A. c/ Sté Habitation moderne.

Accord sur le prix de cession de parts sociales

Selon le Code civil, la vente est parfaite entre les parties, et la propriété est acquise de droit à l'acheteur à l'égard du vendeur, en cas d'accord de ceux-ci sur le bien vendu et son prix.

Les deux associés d'une SARL étaient convenus que chacun d'eux déposerait, entre les mains d'un tiers et dans un délai déterminé, une offre de rachat des parts sociales détenues par l'autre. L'un avait déposé une offre libellée « néant » et l'autre une offre de rachat au prix de 5 000 €. Ce dernier avait demandé l'exécution forcée de la cession tandis que son coassocié avait invoqué l'absence d'un accord sur le prix puisqu'il n'avait

pas accepté le prix unilatéralement fixé par son coassocié.

La Cour de cassation a écarté cet argument*. En effet, les associés étaient convenus d'une procédure précise d'achat par l'associé le plus offrant des parts sociales appartenant à l'autre, chacune des parties s'engageant à accepter le prix proposé par l'autre s'il était le plus élevé et à renoncer par avance à formuler toute surenchère ultérieure. Le prix de vente des parts sociales ne dépendait pas de la seule volonté de l'associé auteur de l'offre chiffrée ni d'accords ultérieurs entre les parties. La vente, faite au prix le plus élevé, était donc parfaite.

La vente est nulle lorsque la fixation du prix dépend de la volonté d'une seule des parties ou de la réalisation d'accords

ultérieurs (jurisprudence constante). Mais, en l'espèce, chaque associé avait donné par avance son consentement au prix le plus élevé qui serait proposé. L'associé qui avait refusé de faire une offre chiffrée pour racheter les parts de son coassocié s'exposait donc au rachat de ses propres parts au prix fixé par ce dernier.

Ainsi, lorsque des associés sont convenus de se faire des offres croisées d'achat de leurs parts sociales en acceptant par avance le prix le plus élevé proposé sans pouvoir surenchérir, la vente est formée au profit de celui qui a fait l'offre la plus forte. ■■

*Cass. com. 29 septembre 2015 n° 14-15.040

TEXTES JURIDIQUES

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 6/12/2015)

Décret n° 2015-1588 du 4 décembre 2015 relatif à l'organisation et au fonctionnement des services de santé au travail des établissements publics de santé, sociaux et médico-sociaux mentionnés à l'article 2 de la loi n° 86-33 du 9 janvier 1986 portant dispositions statutaires relatives à la fonction publique hospitalière

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031567022&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 8/12/2015)

Décision du 20 novembre 2015 portant suspension de fabrication, de mise sur le marché, de distribution, d'exportation et d'utilisation du dispositif médical de diagnostic in vitro dénommé : «fixateur QUALICYT 15 ml Cytologie/Biologie moléculaire» mis sur le marché par la société QUALICYT ainsi que retrait de ce produit

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031572257&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 11/12/2015)

Rapport au Président de la République relatif à l'ordonnance n° 2015-1620 du 10 décembre 2015 adaptant les agences régionales de santé et les unions régionales de professionnels de santé à la nouvelle délimitation des régions

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031593614&dateTexte=&categorieLien=id>

Ordonnance n° 2015-1620 du 10 décembre 2015 adaptant les agences régionales de santé et les unions régionales de professionnels de santé à la nouvelle délimitation des régions

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031593620&dateTexte=&categorieLien=id>

Décret n° 2015-1621 du 9 décembre 2015 relatif aux centres gratuits d'information, de dépistage et de diagnostic mentionnés à l'article L. 3121-2 du code de la santé publique

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031593649&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (JO du 12/12/2015)

Arrêté du 3 décembre 2015 modifiant l'arrêté du 2 décembre 2011 fixant la liste des sections du Comité national de la recherche scientifique

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031600514&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 16/12/2015)

Décision du 13 octobre 2015 portant autorisation de protocole de recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines en application des dispositions de l'article L. 2151-5 du code de la santé publique

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031629632&dateTexte=&categorieLien=id>

Décision du 13 octobre 2015 portant renouvellement de l'autorisation de conservation de cellules souches embryonnaires humaines à des fins de recherche en application des dispositions de l'article L. 2151-5 du code de la santé publique

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031629677&dateTexte=&categorieLien=id>

Décision du 2 novembre 2015 portant autorisation de conservation de cellules souches embryonnaires humaines à des fins de recherche en application des dispositions de l'article L. 2151-5 du code de la santé publique

Texte accessible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000031629689&dateTexte=&categorieLien=id>

ÉCHOS PARLEMENTAIRES

Consommation à risque de viande et de charcuterie

La publication par des scientifiques du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, Lyon), centre de référence OMS, sur le risque de cancer lié à la consommation de viande rouge et de charcuterie a fait réagir des parlementaires. La sénatrice Françoise Férat dit au ministre de l'Agriculture que, alors que l'élevage traverse une crise difficile, il est important de ne pas faire d'amalgame ou de conclusions hâtives. Une alimentation



équilibrée est une priorité de santé publique, la consommation de viande doit être raisonnable. On ne doit pas conclure que manger de la viande est dangereux pour la santé.

Pour son collègue Jean-Paul Fournier il y a un risque pour l'agriculture française : en classant la charcuterie cancérigène et en

ayant une forte suspicion pour la viande rouge, le CIRC ne rend pas service aux éleveurs français déjà fortement touchés par la crise. Car l'étude et son traitement médiatique font un raccourci entre consommation de viande et cancer, sans nullement aborder la qualité du produit et même parfois la quantité consommée. Or les nutritionnistes s'accordent à dire que la viande est un élément important de l'alimentation pour éviter notamment des carences. Ces annonces fracassantes risquent, sans pédagogie, de réduire la consommation de viande française et donc de fragiliser un peu plus les filières, et la boucherie de détail.

Interpellé, le ministère de l'Agriculture rappelle que les conclusions du CIRC rejoignent celles du *World Cancer Research Fund* (WCRF) en 2007, de l'ANSES en 2011 (Nutrition et cancer) et de l'INCa en 2015 qui classaient déjà les viandes rouges et les charcuteries comme facteurs de risque augmentant le risque de cancers évitables, notamment de cancer colorectal. Le risque, explique le ministère, dépend également de l'exposition du consommateur.

Dans son rapport, le WCRF indique que le niveau de consommation moyen doit se situer en dessous du seuil de 500 g/semaine de viande rouge cuite, ce qui revient à ne pas en consommer plus de 70 g/jour. Ces éléments sont en accord avec la position de l'ANSES et de l'INCa qui, pour les charcuteries, conseillent d'en limiter la consommation. Le risque associé à une augmentation de 100 g de viande n'est démontré que chez les gros consommateurs de viande (> 500 g/semaine) et en aucun cas pour une augmentation de 100 g de viande partant d'une consommation nulle.

Il ne faut donc pas laisser entendre que la consommation de viande rouge présente un risque dès la première bouchée de viande. En France, avec 373 g/semaine en moyenne par personne, sa consommation est bien inférieure à ce seuil (CREDOC, enquêtes 2004 et 2007). La tendance est même à la diminution

constante depuis une vingtaine d'années (enquêtes INCA 1999, 2007 de l'AFSSA, 2004 et 2007 du CREDOC).

La viande contribue aux apports en micronutriments tel que le fer, dont la couverture des besoins est loin d'être optimale pour les jeunes enfants, les adolescents, les femmes en âge de procréer et les femmes enceintes. C'est aussi une source essentielle de protéines bien assimilées, avec un rôle important en prévention de la dénutrition des sujets âgés.

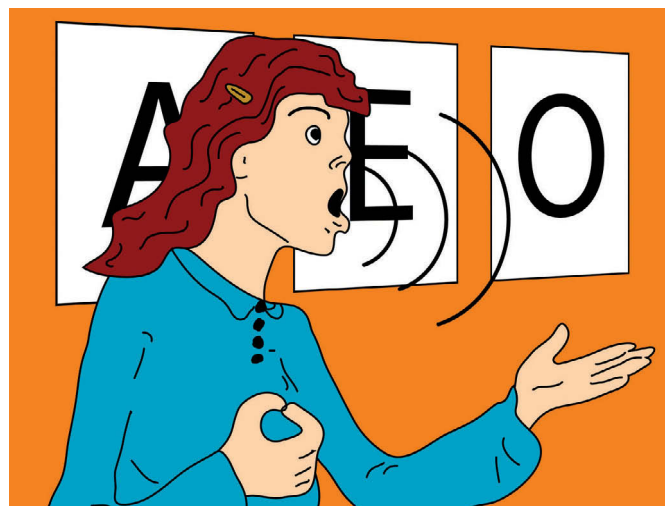
J.-M. M.

Orthophonistes : des hospitaliers déclassés ?

Pascal Allizard, sénateur, signale au ministère de la Santé la situation des soins d'orthophonie dans les hôpitaux publics, une offre qui se dégrade alors que les besoins augmentent, dus notamment à certaines pathologies : maladies dégénératives, accidents vasculaires cérébraux (AIT, AVC)... Après avoir obtenu la reconnaissance de leur profession par une formation correspondant au niveau *master* (bac + 5), les orthophonistes s'inquiètent du décalage entre leurs compétences et le niveau statutaire et salarial proposé en hôpital (bac + 3). Ce décalage entraîne une désaffectation des praticiens préjudiciable à l'hôpital public, à la formation des étudiants et aux professionnels libéraux qui ne peuvent seuls prendre en charge les patients quittant l'hôpital public ! Que fait-on pour renforcer les soins orthophoniques à l'hôpital public et prendre en considération le niveau de compétence des orthophonistes hospitaliers.

Le ministère rassure : actuellement classés statutairement en catégorie B, les orthophonistes, indépendamment de la durée de formation fixée en 2014, doivent intégrer la catégorie A, conformément au *protocole LMD* d'accord du 2/2/2010. L'attractivité de la profession en milieu hospitalier est un problème majeur et le gouvernement est soucieux de l'améliorer. Il a diligenté une enquête auprès des établissements hospitaliers sur la situation des orthophonistes. Ses résultats doivent servir de base à une concertation avec les représentants de la profession et portant notamment sur le lien ville/hôpital. Le gouvernement soutient une disposition dans le projet de modernisation du système de santé, intégrant une nouvelle définition des missions des orthophonistes, qui a été arrêtée consensuellement avec les représentants de la profession.

J.-M. M.



Lyme : Sécurité Sociale et diagnostic en accusation

Régulièrement des parlementaires attirent l'attention du ministère de la Santé sur le problème de la reconnaissance et de la prise en charge par la Sécurité Sociale de la maladie de Lyme, maladie bactérienne (borréliose) dont le vecteur est la tique *Ixodes ricinus*. Certains remettent en cause les techniques de diagnostic.

C'est la maladie à vecteur la plus fréquente aux USA (300 000 nouveaux cas/an) et dans certains pays tempérés de l'hémisphère nord. L'épidémie est d'ampleur similaire au Canada. En Allemagne, les autorités estiment entre 1 et 2 millions le nombre de personnes touchées. On peut considérer que les chiffres avancés par les autorités en France (1 000 à 2 000 cas/an) sont en fait sous-évalués, estime le sénateur Bruno Gilles [27 000, selon l'InVS-NDLR]. En d'autres termes, les tests utilisés ne permettent pas de détecter l'ensemble des porteurs de la maladie qui, ajoute-t-il, fait l'objet de nombreuses controverses au sein de la communauté médicale et scientifique, qu'il s'agisse de la fiabilité du diagnostic, de son caractère chronique et du traitement associé.

Le diagnostic sérologique n'est pas satisfaisant en raison du manque de fiabilité des tests, ce que confirme le Haut Conseil de la santé publique (HCSP) dans un rapport (28/3/2014) sur lequel s'appuient les associations de patients. Si l'on veut éviter la chronicisation de nombreux cas de Lyme avec leurs complications et leur coût, une expertise collective pluridisciplinaire est nécessaire, via un programme de recherche national voire européen pour disposer des données scientifiques les plus récentes et pour actualiser les recommandations issues de la conférence de consensus de la SPILF en décembre 2006, intitulée « Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives ».

Pour Daniel Laurent, les critères de diagnostic, de dépistage et de traitement font l'objet d'une controverse dans le monde médical, de même que le caractère chronique de la pathologie. Mais surtout la borréliose de Lyme est particulièrement méconnue par nos concitoyens, il est indispensable de mener des actions de prévention et d'information [y compris du corps médical]. L'alliance des sciences du vivant (AVIESAN) devrait être saisie afin de disposer d'une expertise multidisciplinaire permettant un état des lieux sur les connaissances vétérinaires, entomologiques, biologiques, épidémiologiques, sociologiques et médicales relatives à la maladie de Lyme et autres pathogènes transmis par les tiques, ainsi que sur l'amélioration des techniques de diagnostic et des stratégies thérapeutiques en lien avec les équipes hospitalo-universitaires et les sociétés savantes concernées.

Pour Hubert Falco, selon les associations de malades qui se mobilisent, cette maladie très invalidante est très peu connue et sous-diagnostiquée dans notre pays, où elle connaît une expansion inquiétante. Dans sa forme chronique, elle est beaucoup plus insidieuse, parce qu'elle peut se réveiller plusieurs mois ou plusieurs années après la piqûre. La prévention et l'information du public sont très insuffisantes et il faut souvent aux patients subir de nombreuses consultations et des *traitements inadéquats* avant d'être dépistés.

Réponse du ministère de la Santé : la borréliose de Lyme fait depuis plusieurs années en France l'objet d'une surveillance épidémiologique et vectorielle. Cette maladie peut être contractée sur tout le territoire (sauf haute montagne et littoral méditerranéen, peu favorables à la survie des tiques). La borréliose de Lyme est une maladie infectieuse d'évolution favorable si elle diagnostiquée et traitée précocement. Le diagnostic repose sur un faisceau

d'arguments cliniques, biologiques et épidémiologiques. Symptomatologie, diagnostic et traitement sont bien documentés en cas de morsure récente et de symptômes comme l'érythème migrant chronique (EMC). À distance de la morsure et devant des symptômes peu spécifiques, la démarche diagnostique et thérapeutique peut être plus difficile et a suscité des *opinions contrastées*.

Le HCSP a été saisi en vue d'une actualisation de l'état des connaissances sur l'épidémiologie, les techniques

diagnostiques et les orientations de traitement et l'identification d'axes de recherche éventuels. Le ministère de la Santé a engagé une réflexion pour renforcer les outils de communication auprès de la population sur les risques liés aux tiques et des professionnels de santé sur la définition simple de repères pour effectuer un diagnostic précoce et d'informations sur la conduite à tenir.

Les performances des tests de dépistage commercialisés seront également évaluées en lien avec l'ANSM et le Centre national de référence des *Borrelia*. L'InVS examinera dans quelles conditions les critères permettant de définir cette maladie comme devant être soumise à déclaration obligatoire. Enfin, l'AVIESAN a été saisi en vue d'une expertise multidisciplinaire permettant un état des lieux de haut niveau et d'une grande rigueur scientifique sur les connaissances vétérinaires, entomologiques, biologiques, épidémiologiques, sociologiques et médicales de la maladie de Lyme et autres pathogènes transmis par les tiques, et sur l'amélioration des techniques diagnostiques et des stratégies thérapeutiques en lien avec les CHU équipes hospitalo-universitaires les plus engagées dans la recherche et les sociétés savantes concernées.

Les parlementaires ont été entendus... ■■

J.-M. Manus

